

**DER AKTIVITÄTSKOEFFIZIENT VON NaCl
IN HOCHKONZENTRIERTEN HÄMOGLOBINLÖSUNGEN
UND IN ERYTHROZYTEN**

von
Norbert Tretter
aus
Erbendorf

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

**DER AKTIVITÄTSKOEFFIZIENT VON NaCl
IN HOCHKONZENTRIERTEN HÄMOGLOBINLÖSUNGEN
UND IN ERYTHROZYTEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Norbert Tretter
aus
Erbendorf

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg

DER AKTIVITÄTSKOEFFIZIENT VON NACH
IN HOCHKONZENTRIERTEN HÄMOGLOBINLÖSUNGEN
UND IN ERYTHROZITEN



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 4. August 1975

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

1.1 Theorie der Gewichte

1

1.2 Theorie der Gewichte gewidmet

1

1.3 Theorie der Gewichte

1

1.4 Theorie der Gewichte ANNA MARIA

1

1.5 Theorie der Gewichte mit einer kleinen Anzahl von Gewichten

1

1.6 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.7 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.8 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.9 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.10 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.11 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.12 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.13 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.14 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.15 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.16 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.17 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.18 Theorie der Gewichte in Lösung

1

1.19 Theorie der Gewichte in Lösung

1

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	METHODIK	6
2.1	Theorie der Messung	6
2.2	Struktur des Hämoglobins	14
2.2.1	Allgemeiner Aufbau	14
2.2.2	Die Polypeptidketten	14
2.2.3	Die Hämgruppe und ihre Bindung an die Aminosäureketten	15
2.2.4	Das Hämoglobin in Lösung	16
2.3	Herstellung der Hämoglobin-Stammlösung	17
2.3.1	Die Gewinnung einer Erythrozytensuspension	17
2.3.2	Die Hämolyse der Erythrozyten	18
2.3.3	Die Entsalzung der Hämoglobin-Stammlösung	19
2.3.4	Die Aufkonzentration der Hämoglobin-Stammlösung	20
2.4	Analyse der Hämoglobin-Stammlösung während und nach der Aufbereitung	23
2.4.1	Bestimmung der Hämoglobinkonzentration	23
2.4.2	Extinktionsmessung	24
2.4.3	Gelchromatographie	26
2.4.4	Messung der spezifischen Leitfähigkeit	28
2.4.5	Bestimmung des Restionengehaltes	31
2.4.6	Bestimmung des pH-Wertes	31
2.5	Herstellung der Hämoglobin-NaCl-Lösungen	32

	Seite
2.6 Messung der mittleren Aktivität	35
2.6.1 Meßanordnung	35
2.6.2 Meßzelle	37
2.6.3 Titrationslösungen	39
2.6.4 Ionenaustauscher-Membranelektroden	39
2.6.5 KCl-Salzbrücken und Elektroden	40
2.6.6 Elektrische Meßgeräte	41
2.6.7 Meßvorgang	42
2.7 Messung der pH-Werte in den Hämoglobin-NaCl-Lösungen bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen	52
3 ERGEBNISSE	53
3.1 Stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizienten	53
3.2 Ergebnisse der pH-Messung	58
4 DISKUSSION	60
4.1 Modelle für die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten der Hämoglobin-NaCl-Lösung	60
4.1.1 Modell I: "Freie" Lösungskomponenten	61
4.1.2 Modell II: Bindung von Wasser am Hämoglobinemolekül	64
4.1.3 Modell III: Bindung von Ionen am Hämoglobinemolekül	66
4.1.4 Modell IV: Bindung von Wasser und Ionen am Hämoglobinemolekül	69
4.2 Berücksichtigung der Protein-Wasser-Wechselwirkung	74

	Seite
4.3	Deutung der Meßergebnisse als elektro- statische mittlere Aktivitätskoeffizien- ten 78
4.4	Deutung der Meßergebnisse durch die spezifische Bindung von Chlorionen am Hämoglobinmolekül 81
4.4.1	Berechnung von $(\gamma_{\pm})$ aus den Meßergeb- nissen 81
4.4.2	Diskussion der Ergebnisse der pH-Messung 82
4.4.3	Berechnung der mittleren Bindungszahl der Chlorionen pro Hämoglobinmolekül aus den Ergebnissen der Messung des mittleren Ak- tivitätskoeffizienten 83
4.4.4	Berechnung der mittleren Bindungszahl der Chlorionen pro Hämoglobinmolekül aus den Ergebnissen der pH-Messung 85
4.5	Anwendung der Theorie der multiplen Gleichgewichte auf die Ergebnisse für die Zahl der gebundenen Chlorionen 90
4.6	Abschätzung des elektrostatischen Anteils am mittleren Aktivitätskoeffizienten 97
5	FEHLERBERECHNUNG 103
5.1	Mittlerer Fehler des mittleren Aktivitäts- koeffizienten 103
5.2	Mittlerer Fehler der im Mittel pro Häm- oglobinmolekül gebundenen Chlorionen 107
5.3	Mittlerer Fehler der im Mittel pro Häm- oglobinmolekül gebundenen Chlorionen 109
6	ZUSAMMENFASSUNG 110

1 Einleitung und Problemstellung

Eine Zelle bildet in einem Organismus die kleinste Einheit, die ihren eigenen Stoffwechsel und alle anderen lebenswichtigen Funktionen besitzt. Eine Zelle "lebt", wenn u.a. im Zytoplasma spezifische Reaktionen ablaufen, wenn ein aktiver und passiver Stoffaustausch und -transport durch die Zellmembran stattfindet und eine Potentialdifferenz zwischen dem intra- und extrazellulären Raum aufrechterhalten wird.

Um einen Einblick in diese komplexen Eigenschaften und Vorgänge zu erhalten, muß man unter anderem Kenntnisse über die chemischen Zusammensetzungen, die Struktur und den physikalisch-chemischen Zustand des Zytoplasmas besitzen.

Eine durchschnittliche Körperzelle setzt sich chemisch aus Wasser (85%), Proteinen (10%), DNS (0,4%), RNS (0,7%), Lipiden (2%) und anorganischen Substanzen (1,5%) zusammen (43).

Da die Lipide vorwiegend an der Zellmembran und DNS und RNS vorwiegend im Kern lokalisiert sind, bleiben als Komponenten für das Zytoplasma das Zellwasser, Proteine und anorganische Substanzen übrig. Das Zellwasser macht sowohl hinsichtlich des Gewichtsanteils als auch der Molekülzahl den weitaus größten Anteil des Zytoplasmas aus. Den Proteinen kommt wegen ihres hohen Gewichtsanteils, ihrer zahlreichen Ladungsgruppen und ihrer vielfältigen Stoffwechselfunktionen eine besondere Bedeutung zu. Die

anorganischen Substanzen - das sind vorwiegend Salze in dissoziierter Form wie K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- , HCO_3^- und $H_2PO_4^-$ - stellen trotz ihres geringen Gewichtsanteils in der molekularen Zusammensetzung einen großen Anteil. Ihre Konzentration im Zytoplasma beträgt bei allen bekannten Zellarten 0,1 bis 0,2 Mol pro kg Zellwasser.

Nach dieser chemischen Zusammensetzung kann man annehmen, daß der physikalisch-chemische Zustand des Zytoplasmas durch die Wassermoleküle, die Protein-Polyionen und die kleinen Salzionen und ihre Wechselwirkungen bestimmt werden.

Für den physikalisch-chemischen Zustand des Zytoplasmas gibt es zwei gegensätzliche Modelle: das eine beschreibt das Zytoplasma als ein "stark strukturiertes, festkörperähnliches System" (?).

In diesem hochgeordneten Zustand sollen die einzelnen Komponenten des Zytoplasmas durch starke Wechselwirkungen in ihrer Beweglichkeit erheblich eingeschränkt sein (23, 34, 35).

Die Festkörperstruktur des Zytoplasmas wurde vor allem von TROSHIN (59) und LING (34, 31-33) postuliert.

Das zweite Modell beschreibt das Zytoplasma als wässrige Lösung von Proteinen und Salzen. Diese Annahme bestätigen Ergebnisse von Messungen der intrazellulären Leitfähigkeit mit hochfrequenten Wechselströmen durch PAULY (38, 40-42), Messungen der Diffusionsgeschwindigkeit kleiner Ionen und Moleküle in der Zelle (10, 30) und Messungen der kalorischen Eigenschaften des Zellwassers (22, 54). Der Zielsetzung und der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit liegt daher die Annahme zugrunde, daß die be-

stimmenden Wechselwirkungen der Komponenten, insbesondere eine weitgehende "Bindung" der Salzionen, sich auch in konzentrierteren Protein-Salz-Lösungen als Zytoplasma-Modelle finden müssen.

Eine besondere Bedeutung im Zytoplasma kommt den kleinen Salzionen zu. Sie sind u.a. verantwortlich für den Aufbau und die Aufrechterhaltung des Zellmembranpotentials, wobei in Ruhe eine hohe intrazelluläre K^+ -Konzentration und ein hoher Na^+ -Ionenkonzentrationsgradient zwischen extrazellulärer Flüssigkeit und Zytoplasma herrscht.

Man nimmt in der sogenannten "Membrantheorie" der Zellphysiologie, die das Zytoplasma als wässrige Lösung betrachtet, an, daß das Membranpotential durch einen "aktiven Transport" von Na^+ - und K^+ -Ionen durch die Zellmembran zustande kommt und aufrechterhalten wird.

In der "Festkörperhypothese" des Zytoplasmas wird das Zustandekommen des Membranpotentials durch Vorhandensein eines mehr oder minder strukturierten "Netzwerkes mit fixierten elektrischen Ladungen" (45) erklärt. Das Zellwasser soll dabei in "geordneten polarisierten Schichten" (33) oder in einer "eisähnlichen Struktur" (45) vorliegen. Die kleinen Ionen hängen in diesem "Netzwerk" fest und büßen so einen erheblichen Teil ihrer Bewegungsfreiheit ein. Dies müßte eine beachtliche Erniedrigung ihres chemischen Potentials zur Folge haben.

Untersuchungen in Zytoplasma-Modellösungen, die aus konzentrierten Proteinsalzlösungen bestanden, zeigten, daß zwar Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten auftreten, diese jedoch selbst bei hohen Proteinkonzentrationen nur verblüffend gering gegenüber denen in reinen

Salzlösungen verändert waren (36, 45, 49, 50). Eine "Bindung" eines größeren Anteils der kleinen Ionen konnte bisher in Proteinsalzlösungen einer Zusammensetzung, die in etwa der des Zytoplasmas entsprach, nicht gefunden werden.

Da in Zytoplasma-Modelllösungen die Komponenten Wassermoleküle, Protein-Polyionen und Salzionen sind, kommen als Wechselwirkungen hauptsächlich in Frage: elektrostatische Wechselwirkungen aller Komponenten untereinander, die Bindung von Wasser an der Oberfläche der Protein-Moleküle und eine spezifische Ionenbindung an den Protein-Polyionen.

Als Maß für die Wechselwirkungen der Salzionen untereinander und mit den Protein-Polyionen dient der mittlere Aktivitätskoeffizient des Salzes.

In bisherigen Untersuchungen mit wässrigen Proteinlösungen und Salzen wurde gefunden, daß von Protein-Polyionen spezifisch Anionen an der Moleküloberfläche gebunden werden (57). Diese Untersuchungen wurden ausschließlich mit niedrigen Proteinkonzentrationen durchgeführt.

In Arbeiten von PFISTER (45) und RÄMISCH (49) wurde neben der spezifischen Ionenbindung an die Protein-Polyionen auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten in den Modelllösungen untersucht. Als Protein wurde hier Rinderserumalbumin verwendet. Da über die spezifische Ionenbindung am RSA-Molekül schon genaueres bekannt war, konnte in diesen Arbeiten der Anteil am mittleren Aktivitätskoeffizienten, der durch die spezifische Bindung bedingt ist, abgetrennt und so die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den geladenen Komponenten quantitativ erfaßt werden.

In weiteren Arbeiten von MENGES (36) und RAU (50), bei denen das Protein in den Modellösungen Hämoglobin war, konnte der Anteil der spezifischen Bindung am mittleren Aktivitätskoeffizienten nicht abgetrennt werden. Aus der Interpretation der Meßwerte geht jedoch hervor, daß eine spezifische Anionenbindung an das Hämoglobinmolekül plausibel erscheint.

Ziel dieser Arbeit ist es nun, die Wechselwirkung von Hämoglobin mit Salzionen weiter zu untersuchen. Als Modellösungen wurden ca. 36 Gew.-%ige Hämoglobin-NaCl-Lösungen verwendet.

Die Hämoglobinkonzentration entsprach damit in etwa der in lebenden Erythrozyten. Die NaCl-Konzentration betrug 0,01 bis 0,5 Mol pro kg Wasser und schloß damit den physiologischen Bereich der Salzkonzentration im Zytoplasma mit ein. Die Lösungen können daher als vereinfachtes Modell des Erythrozyten-Zytoplasmas gelten.

Durch Variation der Salzkonzentration bei konstanter Hämoglobinkonzentration sollte einmal der gesamte Einfluß der Hämoglobinmoleküle auf das chemische Potential des Salzes über einen größeren Konzentrationsbereich quantitativ bestimmt und zum anderen mit Hilfe der Theorie der multiplen Gleichgewichte eine nähere Aussage über die von MENGES (36) und RAU (50) postulierte spezifische Anionenbindung am Hämoglobinmolekül erhalten werden.

2 Methodik

2.1 Theorie der Messung von Aktivitäten mit Membranelektroden

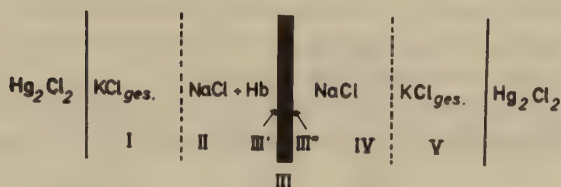
Der Messung von Aktivitäten liegt die Messung der elektromotorischen Kraft, EMK, einer elektrochemischen Zelle mit Membranen zugrunde.

"Die EMK einer elektrochemischen Zelle ist definiert als die elektrische Potentialdifferenz E , die im stromlosen Zustand zwischen den beiden Elektroden der Zelle besteht. Sie kann gemessen werden durch Kompensation mit einer im äußeren Kreis vorgegebenen Spannung gleicher Größe. Thermodynamisch ist die EMK bestimmt durch die geleistete elektrische Arbeit, wenn in einem reversiblen isothermen Prozeß, bei konstantem Druck in jeder Phase, ein Mol elektrische Elementarladung, also ein Faraday, über die Potentialdifferenz E verschoben wird. Diese elektrische Arbeit, $F \cdot E$, ist gleich der Abnahme der freien Enthalpie $-\Delta G$ der elektromotorischen Zelle bei diesem Prozeß"(45).

$$FE = - \Delta G \quad (2.1)$$

wobei: ΔG die Änderung der freien Enthalpie der elektrochemischen Meßzelle,
 F die Faraday-Konstante und
 E die EMK zwischen den beiden Elektroden, gemessen im stromlosen Zustand, ist.

Es werde nun folgende elektrochemische Zelle betrachtet:



Die Phasen I und V sind gesättigte KCl-Lösungen (Salzbrücken), in die je eine Kalomelelektrode eintaucht; Phase II soll eine Lösung von Hämoglobin mit Natriumchlorid darstellen, Phase IV ist eine reine NaCl-Lösung. Phase III sei eine wässrige Membranphase, die nur für Wasser und NaCl durchlässig ist. III' bzw. III'' bedeuten die Teile der Membranphase III, die unmittelbar an Phase II bzw. IV angrenzen.

Die EMK dieser elektrochemischen Zelle berechnet sich nach folgender Gleichung: (45)

$$-FE = \int \sum_i T_i d\mu_i \quad (2.2)$$

Dabei ist: T_i die Transportzahl der Neutralkomponente i ; (entspricht der Zahl der beim Ladungstransport von 1 F in positiver Stromrichtung verschobenen Mole der Sorte i) und

μ_i das chemische Potential der Neutralkomponente i.

Diese Gleichung gibt die EMK der Zelle als Funktion der Transportzahlen und der chemischen Potentiale der Neutralkomponenten der einzelnen Phasen wieder.

Das Integral liefert nur dort Beiträge, wo mindestens für eine Neutralkomponente $d\mu_i \neq 0$ und gleichzeitig $T_i \neq 0$ ist.

Nimmt man an beiden Seiten der Membran scharfe Phasengrenzen gegen die Lösungen an, so "stellt sich an beiden Grenzflächen ein elektrochemisches Gleichgewicht ein:

Die Änderung des chemischen Potentials der durchtrittsfähigen Neutralkomponenten an dieser Stelle ist gleich Null". (45)

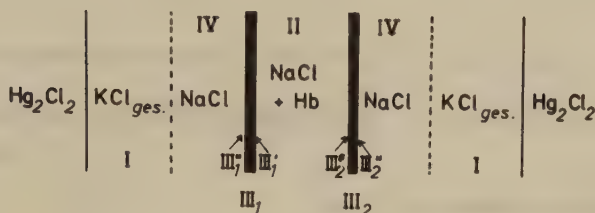
Die Transportzahlen T_i der Neutralkomponenten lassen sich durch die elektrochemischen Überföhrungszahlen t_i ihrer Ionenbestandteile ausdröcken. (45)

Nach der obigen Voraussetzung für die Eigenschaften der Membranphase gilt $T_{Hb} = 0$, d.h. die Hämoglobin-Komponente trägt nicht zur EMK bei.

Unter Berücksichtigung dieser Annahmen erhält man aus Gleichung (2.2) für die EMK:

$$-FE_I = \int_I^{II} (1-t_{Cl^-}) d\mu_{NaCl} + \int_{III'}^{III''} (t_{Na^+} d\mu_{NaCl} + T_{H_2O} d\mu_{H_2O}) + \int_{IV}^I t_{Na^+} d\mu_{NaCl} \quad (2.3)$$

Durch Gegeneinanderschalten zweier Zellen dieses Typs erhält man folgende Doppelzelle:



Die Bezeichnungswiese für gleichartige Phasen von der Zelle des Typs 1 wurde beibehalten.

Die EMK dieser Zelle ergibt sich aus der Differenz zweier EMK-Werte von Zellen des ersten Typs.

$$-F \cdot E_{II} = \int_{III_2}^{III_1} (t_{Na^+} d\mu_{NaCl} + t_{H_2O} d\mu_{H_2O}) - \int_{III_1}^{III_2} (t_{Na^+} d\mu_{NaCl} + t_{H_2O} d\mu_{H_2O}) \quad (2.4)$$

Man erkennt, daß E_{II} nur von Null verschiedene Werte annehmen kann, wenn die beiden Membranen III_1 und III_2 verschiedene Eigenschaften besitzen.

Durch geeignete Wahl von Membranen kann die Gleichung (2.4) zur Bestimmung mittlerer Aktivitäten eines Salzes verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kationen- und Anionenaustauscher-Membran verwendet. Entsprechend der Ionenaustauscher-Eigenschaften gilt somit:

$t_{Na^+} \gg t_{Cl^-}$ in der Kationenaustauscher-Membran,

$t_{Cl^-} \gg t_{Na^+}$ in der Anionenaustauscher-Membran.

Definitionsgemäß gilt: (24)

$$\mu_{NaCl} = \mu_{NaCl,0} + R \cdot T \cdot \ln a_{NaCl} \quad (2.5)$$

wobei: μ_{NaCl} das chemische Potential von NaCl,
 $\mu_{NaCl,0}$ das chemische Standardpotential von NaCl,
 a_{NaCl} die Aktivität von NaCl,
 R die universelle Gaskonstante und
 T die absolute Temperatur ist.

Ferner gilt: (24)

$$a_{NaCl} = (a_{\pm})^2 \quad (2.6)$$

mit $a_{\pm}$ als mittlerer (Ionen-)Aktivität von NaCl

und

$$\mu_{NaCl,0}^{IV} = \mu_{NaCl,0}^{II} \quad (2.7)$$

Mit den Gleichgewichtsbedingungen an den Membrangrenzflächen: (36)

$$\mu_{NaCl}^{III_2} = \mu_{NaCl}^{II} = \mu_{NaCl}^{III_1} \quad (2.8)$$

$$\mu_{NaCl}^{III_2} = \mu_{NaCl}^{IV} = \mu_{NaCl}^{III_1}$$

$$\begin{aligned} \mu_{H_2O}^{III_2} &= \mu_{H_2O}^{II} = \mu_{H_2O}^{III_1} \\ \mu_{H_2O}^{III_2} &= \mu_{H_2O}^{IV} = \mu_{H_2O}^{III_1} \end{aligned} \quad (2.9)$$

und bei Benützung einer Anionenaustauscher-Membran als Phase III_1 und einer Kationenaustauscher-Membran als Phase III_2 erhält man für die EMK der Doppelzelle:

$$-F E_{II} = 2RT \left[(1 - \bar{t}_{Cl}^K - \bar{t}_{Na}^A) \ln \frac{a_{\pm}^{IV}}{a_{\pm}^{II}} + \frac{1}{2} (\bar{t}_{H_2O}^K - \bar{t}_{H_2O}^A) \ln \frac{a_{H_2O}^{IV}}{a_{H_2O}^{II}} \right] \quad (2.10)$$

mit: $\bar{t}_{Na^+}^K, \bar{t}_{Cl^-}^K$	Integralmittelwert der Überföhrungs- zahlen der Na^+ - bzw. Cl^- -Ionen in der Kationenaustauscher-Membran,
$\bar{t}_{Na^+}^A, \bar{t}_{Cl^-}^A$	Integralmittelwert der Überföhrungs- zahlen der Na^+ - bzw. Cl^- -Ionen in der Anionenaustauscher-Membran,
$\bar{T}_{H_2O}^K, \bar{T}_{H_2O}^A$	Integralmittelwert der Transportzah- len für Wasser in der Kationen- bzw. Anionenaustauscher-Membran,
$a_{\pm}$	mittlere Aktivität von NaCl
a_{H_2O}	Aktivität des Wassers
R	universelle Gaskonstante
T	absolute Temperatur

Mit dieser Gleichung ist eine Beziehung zwischen der meß-
baren EMK und der mittleren Aktivität von NaCl in Phase II
und IV gegeben.

Sie bildet die theoretische Grundlage für die Messung des
mittleren Aktivitätskoeffizienten.

Es konnte gezeigt werden, daß der 2. Summand im Klammer-
ausdruck von Gleichung (2.10) vernachlässigt werden kann (45).
Für ideale Membranen ohne Coionenüberföhrung, d.h.

$\bar{t}_{Cl^-}^K = \bar{t}_{Na^+}^A = 0$, wird der Faktor in den Klammern vor
dem Logarithmus gleich eins. Für diesen Fall geht Gleichung
(2.10) über in:

$$E = - \frac{2 \cdot R \cdot T}{F} \ln \frac{a_{\pm}^N}{a_{\pm}^I} \quad (2.11)$$

Dies entspricht der Gleichung für die EMK einer HELMHOLTZ'schen Doppelzelle mit reversiblen Na^+ - und Cl^- -Elektroden (29). Daher stammt der Name "Membranelektroden" (54).

Mit Hilfe der Nulltitrationsmethode (siehe Abschnitt 2.6.7) von SOLLNER (54) kann man die mittlere Aktivität von NaCl in Phase II bestimmen: Denn für den Spannungswert Null gilt:

$$(a_{\pm}^{\text{II}}) = (a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0} \quad (2.12)$$

wobei $a_{\pm}^{\text{II}}$ die mittlere Aktivität von NaCl in Phase II und

$(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$ die mittlere Aktivität von NaCl in Phase IV, für die E gleich Null wird, bedeutet.

Die Meßgröße $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$ erhält man durch Verändern der NaCl-Konzentration in den Phasen IV ("Titrationlösungen"), bei unveränderter Phase II ("Meßlösung"), bis die EMK der Zelle gleich Null wird.

Die praktische Durchführung zur Ermittlung von $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$ wird in Abschnitt 2.6.7 beschrieben.

2.2 Struktur des Hämoglobins

2.2.1 Allgemeiner Aufbau

Rinderhämoglobin ist ein Molekül vom Molekulargewicht 64 500 (4). Vier seiner etwa 10 000 Atome sind Eisenatome, die mit Porphyrin vier Hämgruppen bilden. Die restlichen Atome befinden sich in vier, paarweise identischen Polypeptidketten: Ein Teil des einen Paares, bekannt als die α -Kette, enthält 141 Aminosäuren (AS), ein Teil des anderen Paares, die β -Kette, enthält 146 Aminosäuren. Die vier Ketten sind um Achsen einer zweigefalteten Symmetrie tetraedrisch angeordnet. (44)

2.2.2 Die Polypeptidketten

Die Information über ihre Aminosäuresequenz stammt von SCHROEDER et al., BRAUNITZER et al., HILL und KONIGSBERG et al. (62)

Innerhalb einer solchen Kette lösen sich nun helikale und nicht-helikale Bereiche ab. In der β -Kette des menschlichen Hämoglobins zum Beispiel sind es 9 helikale und 4 nicht-helikale Abschnitte; dazu kommt noch das C- und N-terminale Ende. Die einzelnen helikalen Abschnitte sind von A bis H, die nicht-helikalen sind zum

Beispiel mit AB bezeichnet, wenn, wie in diesem Beispiel, das nicht-helikale Segment zwischen der A- und B-Helix liegt.

Dieser Wechsel von helikalen und nicht-helikalen Bereichen führt nun dazu, daß die einzelnen Ketten eine räumliche, gefaltete, tertiäre Struktur annehmen. Durch diese Faltung kommt es - wie bei jedem anderen Protein - zu Wechselwirkungen der AS-Seitenketten untereinander, wobei hauptsächlich die polaren und nicht-polaren Wechselwirkungen zu unterscheiden sind. So gibt es in der α -Kette des Pferde-Hämoglobins 72, in der β -Kette 78 nicht-polare Reste. Ein Teil der nicht-polaren, nämlich 36, befinden sich im Inneren des Moleküls, der Rest liegt an der Oberfläche. Die polaren Reste liegen alle an der Oberfläche mit Ausnahme der beiden ans Häm gebundenen Histidinreste.

Das Molekül vermittelt so den Eindruck, daß die ganze Oberfläche mit polaren Gruppen ausgestattet ist, und diese können nun sowohl Bindungen mit Wassermolekülen als auch mit anderen polaren Gruppen eingehen. Einige dienen natürlich der Bindung der einzelnen AS-Ketten untereinander zum Hämoglobinmolekül.

2.2.3 Die Hämgruppe und ihre Bindung an die AS-Ketten

Außer den beiden Histidinresten, von denen einer unterhalb und einer oberhalb des Zentrums der Hämgruppe liegt, liegen noch neun weitere AS-Reste in unmittelbarer Nähe eines jeden Hämoleküls, drei oberhalb und vier unterhalb

der einzelnen Porphyrinringe. Die Art der einzelnen AS-Reste ist natürlich von Kette zu Kette verschieden.

2.2.4 Das Hämoglobin in Lösung

In einer Lösung befindet sich das Hämoglobinmolekül als Tetramer in einem dynamischen Gleichgewicht mit Dimeren und Monomeren. Die Einstellung des Gleichgewichts hängt von einigen Faktoren ab, einschließlich von der Natur des Liganden am Eisenatom und der Konzentration des Hämoglobins ⁺), der neutralen Elektrolyte und der Wasserstoffionen. Eine symmetrische Dissoziation in Dimere des Typs $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta$ findet nur bei hoher Konzentration neutraler Elektrolyte, bei Zugabe von Harnstoff oder unter dem Einfluß von alkalischem oder sauerem pH statt. (ROSSI-FANELLI, ANTONINI und CAPUTO 1964, WYMAN 1964)

Die Dissoziationskonstante dieser Reaktion ist bei einer NaCl-Konzentration von 0,1 M ca. $9 \cdot 10^{-5}$ und steigt bei einer NaCl-Konzentration von 3 M auf ca. $2 \cdot 10^{-3}$. (12,58)

Die Dissoziation in Monomere ist ebenfalls möglich, jedoch wurden merkliche Konzentrationen von Monomeren erst

⁺) Nach Untersuchungen von DRABKIN u. HINSON (17) und JOPE (27) ist das Lambert-Beer'sche Gesetz bei Hämoglobinlösungen bis zu Konzentrationen von über 40 Gew.-% erfüllt, was bedeutet, daß auch hochkonzentrierte Hämoglobinlösungen als echte Lösungen behandelt werden können.

bei einem pH unter 4,9 und über 11 beobachtet. (28)

Eine unsymmetrische Dissoziation von Typ $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons \alpha_2 + \beta_2$ wurde nicht beobachtet.

2.3 Herstellung der Hämoglobin-Stammlösung

2.3.1 Die Gewinnung einer Erythrozytensuspension

Die Hämoglobin-Stammlösung wurde aus einer ca. 0,6%-igen Natrium-Citrat-Rinderblut-Lösung (1,5 l einer 3,2%-igen Na-Citratlösung, p.A. MERCK, wurden mit 5,5 l Rinderblut gemischt) hergestellt. Die Aufbereitung geschah teilweise in Anlehnung an die Methode nach DRABKIN (16), HINSON (26) und BERGER (8). Mit der Aufbereitung wurde spätestens dreißig Minuten nach der Blutentnahme begonnen.

Zuerst wurde das Plasma und auch teilweise die anderen Bestandteile des Blutes, wie Leukozyten, abzentrifugiert. (CHRIST, Kühlzentrifuge; Typ: JUNIOR II KS; 40 Minuten bei 2 600 rpm, entsprechend 1 950 g, und 4°C). Das überstehende Plasma und die gelblich-weiße Leukozytenschicht wurde mit Hilfe einer Pipette und einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die auf diese Weise erhaltene dickflüssige Erythrozytensuspension wurde nun vier Waschvorgängen unterzogen. Einmal mit einer 0,9%-igen und dreimal mit einer 1,2%-igen NaCl-Lösung bei einem Mischungsverhältnis

von Erythrozytensuspension zur Waschlösung von jeweils 1 : 5⁺). Die verwendeten Waschlösungen (NaCl p.A.; MERCK) wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Nach jedem Waschvorgang (CHRIST, Kühlzentrifuge; Typ: JUNIOR II KS, 20 Minuten bei 5 600 rpm, entsprechend 5 470 g und 4°C) wurde der Überstand wie oben beschrieben abgesaugt und die übriggebliebene Erythrozytensuspension im besagten Mischungsverhältnis mit der entsprechenden Waschlösung wieder aufgefüllt.

Nach der letzten Wäsche wurden die Erythrozyten mit einer Ultrazentrifuge (BECKMANN, SPINCO L 2, Rotor 19; 90 Minuten, 19 000 rpm, entsprechend 17 000 bis 53 000 g, und 4°C) dicht gepackt.

2.3.2 Die Hämolyse der Erythrozyten

Zur Hämolyse wurden die dichtgepackten Erythrozyten mit demineralisiertem Wasser und Toluol im Volumenverhältnis von 1 : 1,2 : 0,4 gemischt, das Hämolysat anschließend über Nacht bei 4°C im Kühlraum kräftig gerührt (ca. 6 bis 8 Stunden). Durch den Zusatz von Toluol wurde zusätzlich ein Wachstum von Bakterien in der Hämoglobininlösung verhindert. Bei Nicht-Anwendung von Toluol hatte sich gezeigt, daß das Hämoglobin nach wenigen Tagen - wahrscheinlich durch bakterielle Zerstörung - für diese Messung unbrauch-

⁺) Die von DRABKIN (16) erwähnte Zugabe von 0,0025 Molen AlCl₃ zur Waschlösung führte nach MENGES (36) zur Koagulation der Erythrozyten und wurde daher hier weggelassen.

bar wurde. Das Toluol bewirkte keine nachweisbare Änderung am Hämoglobinmolekül (siehe Gelchromatographie und Spektroskopie in Abschnitt 2.4.3 bzw. 2.4.2). Nach HINSON und McMEEKIN (26) wirkt sich die Gegenwart von Toluol sogar günstig auf die Hämoglobinkristallbildung aus.

Durch anschließendes Zentrifugieren (CHRIST, Kühlzentrifuge; Typ: JUNIOR II KS; 90 Minuten bei 2 600 rpm entsprechend 1 950 g und 4°C) konnte das Toluol und der überwiegende Teil des Erythrozytenstromas entfernt werden. Durch nachfolgendes Ultrazentrifugieren (BECKMANN, SPINCO L 2, Rotor 19, 90 Minuten, 19 000 rpm, entsprechend 17 000 bis 53 000 g, und 4°C) konnten schließlich die letzten, in der Hämoglobininlösung noch vorhandenen Membranpartikel der Erythrozyten abgetrennt werden. So erhielt man eine Hämoglobininlösung von weinroter Farbe in einer Konzentration zwischen 8 und 10 Gew.-%. Nach MENGES (36) zeigte die mikroskopische Kontrolle im Dunkelfeld eine durchgehend klare und homogene Lösung.

2.3.3 Die Entsalzung der Hämoglobin-Stammlösung

Die auf diese, in den Abschnitten 2.3.1 und 2.3.2 beschriebene Weise erhaltene Hämoglobin-Stammlösung wurde nun zweimal durch eine Mischbett-Ionenaustauschersäule (BIO-RAD, AG 501 - X8(D) bei 4°C) (8) geschickt. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Behandlung der Hämoglobininlösung mit dem Ionenaustauscher keinerlei Veränderungen am Hämoglobinmolekül bewirkt. (Siehe Gel-

chromatographie und Spektroskopie in Abschnitt 2.4.3 bzw. 2.4.2)

Der Grad der Entsalzung wurde durch Leitfähigkeitsmessungen der Hämoglobinlösung und durch Messung am EPPENDORF-Flammenphotometer jeweils vor und nach der Behandlung mit dem Ionenaustauscher kontrolliert (siehe unten).

2.3.4 Die Aufkonzentration der Hämoglobin-Stammlösung

Die Aufkonzentration der Hämoglobin-Stammlösung von ca. 8 Gew.-% bis auf über 40 Gew.-% erfolgte durch Ultrafiltration. Die hierzu verwendeten Geräte stammten von der Firma SARTORIUS MEMBRANFILTER GmbH, Göttingen.

Die Hämoglobin-Stammlösung wurde mit einer Membranpumpe (Typ: SM 168 96) mit einer Förderleistung von 500 ml Wasser in der Minute angesaugt und mit 2 kp/cm^2 in ein Ultrafiltrationsgerät (Typ: SM 165 25) gedrückt. (Siehe auch Abbildung 2.1)

Das Ultrafiltrationsgerät bestand aus fünf übereinander liegenden Platten aus Polycarbonat (Makrolon der Farbfabrik BAYER), zwischen denen Ultrafiltrationsmembranen mit einer gesamten Filtrationsfläche von 750 cm^2 lagen (Typ: SM 121 36) aus Cellulosenitrat mit einer Durchlässigkeit von Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 10 000; Porendurchmesser 5 nm, Durchlässigkeit für Wasser: $0,5 - 0,3 \cdot 10^{-2} \text{ ml/min u. cm}^2$ bei einer Druckdifferenz von 700 mmHg).

Nach dem Verlassen des Ultrafiltrationsgerätes wurde die

Hämoglobin-Stammlösung über ein Druckaufbauventil wieder in das ursprüngliche Gefäß zurückgeleitet.

Das auf der nicht vom Hämoglobin benetzten Seite der Membranen austretende Ultrafiltrat wurde abgeleitet und in einem Gefäß aufgefangen.

Die Filtrationsmenge betrug am Anfang, also bei niedriger Hämoglobinkonzentration, 250 ml/h, nahm dann bei steigender Hämoglobinkonzentration ab und sank schließlich bei über 40 Gew.-% auf 70 ml/h.

Das Ultrafiltrat wurde mit Hilfe von NESSLER's Reagenz auf Ammoniakspuren, die bei der bakteriellen Zersetzung von Proteinen zwangsläufig auftreten, untersucht. Das Ergebnis war jedesmal negativ.

Während des gesamten Filtrationsvorganges wurde die Hämoglobin-Stammlösung mit einem Magnetrührer bei mittlerer Umdrehungszahl gerührt. Die gesamte Apparatur war in einem Kühlraum bei 4°C installiert und die Aufkonzentration dauerte etwa 12 - 16 Stunden.

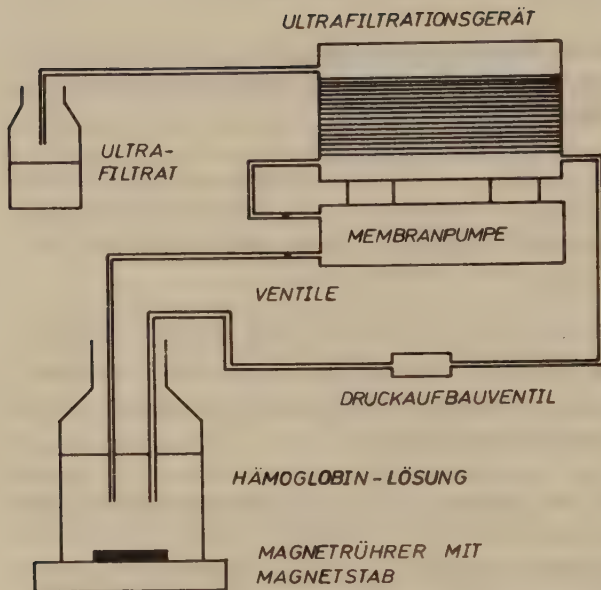


Abb. 2.1: Aufkonzentration der Hämoglobin-Stammlösung:

Mit Hilfe einer Membranpumpe wurde mit einem PVC-Schlauch (Durchmesser 0,35 mm) die Hämoglobin-Stammlösung, die ständig mit einem Magnetstab gerührt wurde, aus einem Glasbehälter angesaugt und in das Ultrafiltrationsgerät mit einem Druck von 2 kp/cm^2 gedrückt. Nach dem Verlassen des Ultrafiltrationsgerätes lief sie dann über ein Druckaufbauventil wieder in den Glasbehälter zurück.

Das auf der nicht vom Hämoglobin benetzten Seite der Membranen im Ultrafiltrationsgerät austretende Ultrafiltrat wurde in einem zweiten Behälter aufgefangen.

2.4 Analyse der Hämoglobin-Stammlösung während und nach der Aufbereitung

2.4.1 Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

Die Hämoglobinkonzentration wurde mit Hilfe der Trockengewichtsbestimmung ermittelt. Etwa 2 - 3 ml Hämoglobinlösung wurden bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und jeweils vor und nach dem Trocknen mit einer Mikrowaage (METTLER, Analysewaage B6) gewogen. Die Genauigkeit der Trockengewichtsbestimmung betrug $\pm 0,1 \%$.

Die Molalität an Hämoglobin berechnete sich nach der Gleichung:

$$m_{Hb} = \frac{\xi \cdot 1000}{(1 - \xi) G_{Hb}} \quad (2.13)$$

wobei m_{Hb} die Anzahl der Mole Hämoglobin pro kg Wasser
 ξ der Hämoglobintrockengewichtsanteil und
 G_{Hb} das Molekulargewicht des Hämoglobins
(MG = 64 500) (4) ist.

Die Konzentration der Hämoglobin-Stammlösung betrug $8,919 \cdot 10^{-3}$ Mol pro kg Wasser entsprechend 36,52 Gew.-%. Sie wurde durch Verdünnung mit demineralisiertem Wasser aus einer über 40 Gew.-%igen Hämoglobinlösung hergestellt.

2.4.2 Extinktionsmessung

Es wurden Extinktionsmessungen vor und nach der Behandlung mit dem Ionenaustauscher und auch nach der Aufkonzentration durchgeführt.

Sämtliche Messungen, auch die, die erst sieben Tage nach der Aufbereitung durchgeführt wurden, zeigten das Spektrum von Oxyhämoglobin (HbO_2 , siehe Abbildung 2.2) mit Extinktionsmaxima bei 414 nm (Soret-Bande), 540 und 578 nm. (2)

Somit enthielt keine der Lösungen Methämoglobin, dessen Extinktionsmaxima bei 404 und 500 nm liegen. Außerdem war damit nachgewiesen, daß keine Denaturierung im Bereich der prosthetischen Gruppe und an dieser selbst eingetreten ist.

Die Extinktionsmessung wurde immer mit einer 0,02 %igen Hämoglobinlösung durchgeführt (was einer Molarität von $3,10 \cdot 10^{-6}$ Mol pro kg Wasser entspricht).

Als Meßgerät diente das Spektralphotometer PM Q II der Firma CARL ZEISS Oberkochen/Württemberg.

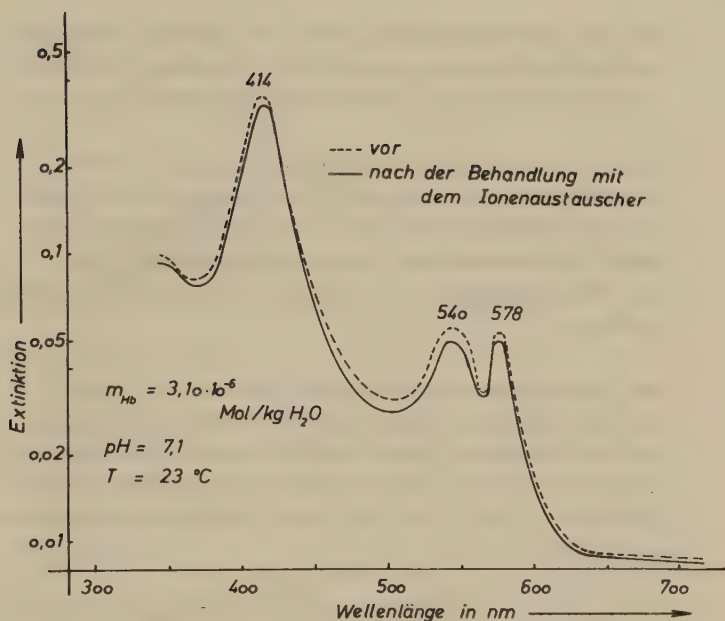


Abb. 2.2: Extinktionskurve der Hämoglobin-Stammlösung

(-----) vor und
(——) nach der Behandlung mit dem
Ionenaustauscher

Dekadischer Logarithmus der Extinktion in
Abhängigkeit von der Wellenlänge in nm.
Hämoglobinkonzentration: $3,10 \cdot 10^{-6}$ Mol pro
kg Wasser (entsprechend 0,02 Gew.-%)
pH = 7,1; Temperatur: $23^\circ C$

2.4.3 Gelchromatographie ⁺)

Die Hämoglobin-Stammlösung wurde vor und nach der Behandlung mit dem Ionenaustauscher auf Veränderung am Hämoglobin-Molekül mit Hilfe der Gelchromatographie untersucht.

Hierzu diente eine ca. zwei Meter lange, mit SEPHADEX G 150 gefüllte Säule, die bei 4°C in einem Kühlraum stand. Die Säule wurde mit einer 0,1 molalen NaCl-Lösung (p.A. MERCK), die zusätzlich 0,02%-iges Natriumazid enthielt und vorher sterilisiert und entgast wurde, drei Tage äquilibriert.

Bei jeder Chromatographie wurden jeweils 6 ml einer ca. 0,6 Gew.-%igen Hämoglobin-Stammlösung aufgetragen. Die Elutionsflüssigkeit wurde mit Hilfe eines Fraktionsammlers zu je 3 ml aufgefangen und mit dem Spektralphotometer PM Q II der Firma CARL ZEISS Oberkochen/Württemberg bei 280 nm ausgewertet.

Es ergab sich, daß im Chromatogramm in jedem Falle immer nur ein einziger steiler und annähernd symmetrischer Peak erschien. (Siehe Abbildung 2.3)

Daraus darf geschlossen werden, daß zumindest während der Aufbereitung keine ausgeprägte Denaturierung, Dimerisierung, Aggregation oder Molekülbrüche am Hämoglobinmolekül entstanden.

⁺) Für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Gelchromatographie danke ich Frau Dr. H. Schüßler und Herrn M. Peuten.

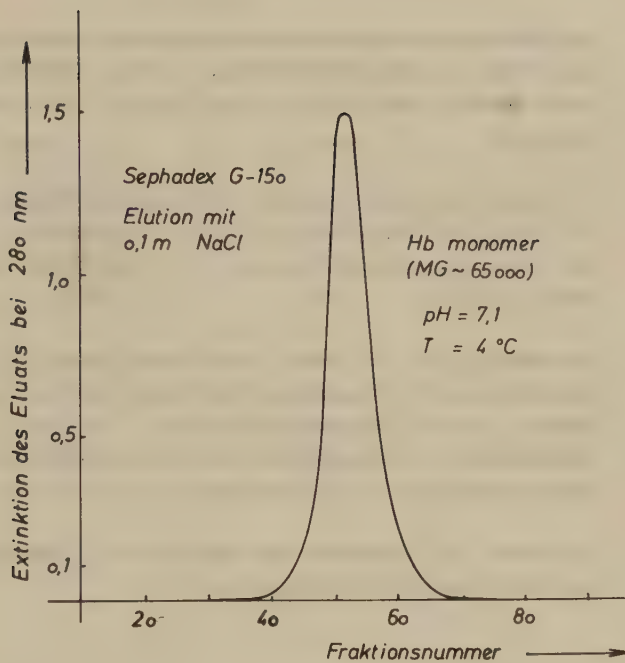


Abb. 2.3: Gelchromatogramm der Hämoglobin-Stammlösungen

Extinction des Eluats bei 280 nm in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (Fraktionsnummer).

SEPHADEX-G-150-Säule: Elution mit 0,1 molaler NaCl-Lösung unter Zusatz von 0,02 %-igem Natriumazid.

pH = 7,1; Temperatur 4 °C

2.4.4 Messung der spezifischen Leitfähigkeit

Die Messung der spezifischen Leitfähigkeit wurde mit der UNIVERSAL-IMPEDANZBRÜCKE (Typ: 1 650-A, GENERAL RADIO COMPANY, West Concord, Massachusetts, USA) durchgeführt.

Die spezifische Leitfähigkeit der Hämoglobin-Stammlösung vor der Behandlung mit dem Ionenaustauscher, bei einer Konzentration von ca. 8 - 10 Gew.-% lag bei $0,425 \mu S \cdot m^{-1}$

Die Abhängigkeit der spezifischen Leitfähigkeit von der Konzentration der Hämoglobin-Stammlösung nach der Behandlung mit dem Ionenaustauscher ist in Tabelle 2.1 und Abbildung 2.4 dargestellt. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von $23^{\circ}C$ durchgeführt.

Als Formel zur Berechnung der spezifischen Leitfähigkeit aus dem gemessenen Widerstand diene:

$$\kappa = \frac{1}{R \cdot c} \quad (2.14)$$

wobei κ die spezifische Leitfähigkeit in $\mu S \cdot cm^{-1}$,
 R der gemessene Widerstand und
 c die Zellkonstante der verwendeten Meßzelle ist.

Tab. 2.1: Widerstand und Leitfähigkeit der Hämoglobin-Stammlösung bei verschiedenen Hämoglobinkonzentrationen.

(Temperatur während der Messung: 23°C)

Konzentr. der Hb-Lösung in Gew.-%	Widerstand $R (\Omega \cdot 10^{-3})$	Leitfähigkeit $\kappa (\mu S \text{ cm}^{-1})$
2,20	160	7,35
5,51	98	12,00
11,03	62	18,98
16,54	54	21,79
22,05	53	22,20
27,57	54	21,79
33,08	65	18,10
40,27	82	14,35

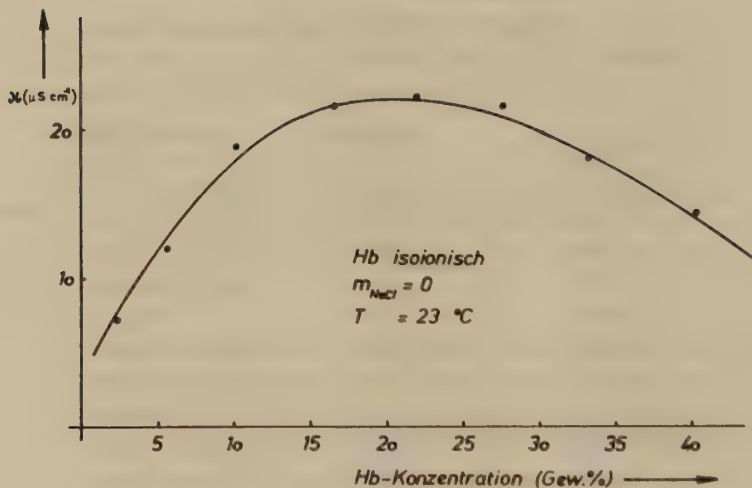


Abb. 2.4: Leitfähigkeit der Hämoglobin-Stammlösung in
 Abhängigkeit der Hämoglobinkonzentration.
 pH = 7,1; Temperatur 23°C

2.4.5 Bestimmung des Restionengehalts

Die nach dem Ionenaustausch erhaltene Hämoglobin-Stamm-lösung wurde im Gewichtsverhältnis 1 : 1 000 mit de-mineralisiertem Wasser verdünnt.

Als Standard-Lösung wurde eine $5 \cdot 10^{-5}$ molale NaCl-Lösung (p.A., MERCK) bzw. eine $5 \cdot 10^{-5}$ molale KCl-Lösung (p.A., MERCK) verwendet.

Die Messungen mit dem Flammenphotometer (EPPENDORF 700, Firma NETHELER + HINZ, Hamburg) ergaben bei jeder Auf-bereitung nach der Behandlung mit dem Ionenaustauscher eine NaCl-Konzentration von $\approx 8 \cdot 10^{-5}$ molal. Die KCl-Kon-zentration lag noch um zwei Zehnerpotenzen niedriger. Daraus folgt, daß die Unsicherheit bei der NaCl-Einwaage weniger als 1% bei einer 10^{-2} m NaCl-Lösung ist.

2.4.6 Bestimmung des pH-Wertes

Zur Bestimmung des pH-Wertes der Hämoglobin-Stammlösung diente ein RADIOMETER-pH-Meter (Typ: 25 SE der Firma RADIOMETER, Kopenhagen) mit einer Einstabglaselektroden-kette. Der pH-Wert der Hämoglobin-Stammlösung betrug bei 23°C $7,10 \pm 0,05$ pH-Einheiten.

2.5 Herstellung der Hämoglobin-NaCl-Lösung

Aus der Hämoglobin-Stammlösung einer Blutaufbereitung wurden durch Zuwägung von NaCl (p.A.; MERCK, 24 Stunden bei 110°C getrocknet) jeweils 7 Hämoglobin-NaCl-Lösungen mit NaCl-Molalitäten zwischen 0,01 und 0,5 Mol pro kg Wasser hergestellt. Um, besonders bei den niedrigen Konzentrationen, den Wägefehler bei der Einwaage der NaCl-Mengen möglichst niedrig zu halten, wurde eine Inkrementierungs-Methode angewandt:

Zunächst wurde für die gesamte Hämoglobin-Stammlösung die NaCl-Konzentration auf den niedrigst verwendeten Wert von 0,0102 Mol NaCl pro kg Wasser eingestellt.

Nach Abzweigung einer Menge von etwa 30 bis 50 Gramm als erste Meßlösung wurde in die Restlösung diejenige NaCl-Menge zugegeben, die zur Einstellung der nächst-höheren NaCl-Konzentration nötig war. Dieses Verfahren wurde fortgesetzt, bis die höchste benötigte NaCl-Konzentration von 0,517 Mol pro kg Wasser erreicht war. So konnte erreicht werden, daß die einzuwiegende NaCl-Menge in keinem Fall geringer als 0,1 Gramm und daher der Wägefehler für jede Einzelwägung kleiner oder höchstens gleich $\pm 0,1\%$ betrug.

Die Bestimmung der Menge der Ausgangslösung des jeweiligen Konzentrationsschrittes erfolgte ebenfalls durch Wägung auf $\pm 0,1\%$ genau.

Die NaCl-Menge s_n in Gramm, die zur Einstellung der n-ten Hämoglobin-NaCl-Lösung der NaCl-Molalität m_n zu der entsprechenden Hämoglobin- bzw. Hämoglobin-NaCl-Ausgangslö-

sungsmenge $H_{(n-1)}$ in Gramm mit einer NaCl-Molalität von $m_{(n-1)}$ Mol pro kg Wasser hinzugewogen werden mußte, ergab sich nach der Beziehung:

$$s_n = H_{(n-1)} \frac{(m_n - m_{(n-1)}) \cdot M \cdot (1 - \xi)}{1000 \cdot \prod_{i=0}^{n-1} (1 + s_i')} \quad s_i' = \frac{s_i}{H_{(i-1)}}$$

(2.15)

wobei: s_n der Hämoglobinlösung beim n-ten Schritt zuzugebende Salzmenge in Gramm,
 s_i' zuzugebende NaCl-Menge in Gramm pro Gramm der jeweiligen Ausgangslösung,
 $H_{(n-1)}$ Ausgangsmenge der Hämoglobin- bzw. Hämoglobin-NaCl-Lösung in Gramm bei der n-ten NaCl-Zugabe,
 m_n , Konzentration von NaCl in der Hämoglobin-NaCl-Lösung in Mol pro kg Wasser,
 $m_{(n-1)}$ nach bzw. vor der n-ten NaCl-Zugabe,
 M Molekulargewicht von NaCl,
 ξ Trockengewichtsanteil der Hämoglobin-Stammlösung vor Beginn der Salzeinwaage.

Zur Herstellung der Hämoglobin-NaCl-Meßlösungen waren somit bis zu 14 Wägungen notwendig. Wie sich durch eine ausführliche Fehlerrechnung zeigen läßt (PFISTER, persönliche Mitteilung), beträgt bei einem Einwägefehler und einem Fehler der Trockengewichtsbestimmung von jeweils $\pm 0,1\%$ die

gesamte, durch Wägefehler bedingte relative Ungenauigkeit in der NaCl-Molalität der Meßlösungen $\pm 0,08$ bis $\pm 0,14$ %.

Die auf diese Weise hergestellten Hämoglobin-NaCl-Lösungen wurden bis zur Messung in kleinen Polyäthylenflaschen bei 4°C aufbewahrt.

2.6 Messung der mittleren Aktivität von NaCl

2.6.1 Meßanordnung

Die Messung der mittleren Aktivität von NaCl in konzentrierten Hämoglobininlösungen geschah nach der Methode von PFISTER (45) mit Ionenaustauscher-Membranelektroden. (Siehe dazu Abbildung 2.5)

Dazu wurde eine Dreikompartiment-Meßzelle (siehe Abschnitt 2.6.2 und Abbildung 2.6) verwendet, deren einzelne Kompartments durch eine Anionen- (AM) bzw. Kationenaustauscher-Membran (CM) getrennt waren. Die mittlere Kammer enthielt immer die Hämoglobin-NaCl-Lösung (NaCl-Hb), die äußeren beiden Kammern die jeweiligen NaCl-Titrationslösungen (NaCl) gleicher Konzentration.

Die Lösungen in den drei Kompartments konnten durch ein regelbares Rührwerk (St) gerührt werden. In die Außenkammern tauchten die KCl-Salzbrücken (SB) ein, die mit zwei Thalamid-Elektroden (El) in Verbindung standen. Diese waren wiederum mit den elektrischen Meßgeräten zur Registrierung der EMK verbunden (Meßverstärker, VRE; Anzeigeinstrument, J; Potentiometerschreiber, R).

Bis auf das Anzeigeinstrument und den Potentiometerschreiber stand die gesamte Meßanordnung in einem Faraday'schen Käfig aus Maschendraht. Dadurch wurden statische und hochfrequente elektrische Störfelder abgeschirmt.

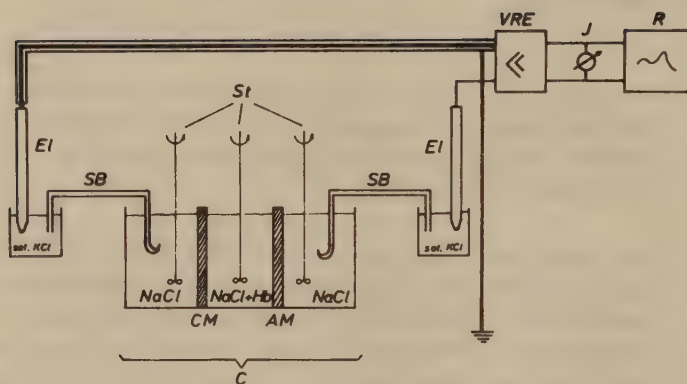


Abb. 2.5 : Schematischer Aufbau der Meßanordnung zur Bestimmung der mittleren Aktivität von NaCl in konzentrierten Hämoglobininlösungen mit Ionenaustauscher-Membranelektroden.

- C : Dreikompartiment-Meßzelle;
- CM : Kationenaustauschermembran;
- AM : Anionenaustauschermembran;
- St : Rührvorrichtung;
- SB : Salzbrücken;
- V : Vorratsgefäß (gesättigte KCl-Lösung);
- El : Thallium-Elektroden;
- VRE: Meßverstärker;
- J : Anzeigeinstrument;
- R : Potentiometerschreiber.

2.6.2 Meßzelle

In Abbildung 2.6 ist die Dreikompartiment-Meßzelle im Längsschnitt dargestellt. Sie wurde aus Plexiglas hergestellt ⁺).

Die einzelnen Kammern werden durch mit Schrauben verbundenen Flanschen (F) zusammengehalten. Sie werden durch Ionenaustauschermembranen getrennt, die ihrerseits wieder an O-Ringe aus Silikongummi angepreßt werden, wodurch eine, durch PFISTER (45) nachgewiesene einwandfreie Abdichtung der einzelnen Kompartments entstand.

Die Fläche der Ionenaustauscher-Membranen, die mit den Lösungen in Kontakt steht, beträgt jeweils ca. $0,12 \text{ cm}^2$.

Die einzelnen Kompartments (I, II, III) haben ein Volumen von 3 - 5 ml.

Jede Kammer konnte durch einen Einfüllstutzen (St) gefüllt werden. Durch diese Einfüllstutzen werden auch die aus Glasstäben bestehenden Rührstäbe eingeführt.

In die an den Außenkammern angebrachten Elektrodenräumen (Er) wurden die Salzbrücken eingebracht. Diese Elektrodenräume standen durch 2 mm-Bohrungen mit den eigentlichen Lösungsräumen in Verbindung.

Diese Vorrichtung hat den Vorteil, daß die Salzbrücken-Kapillaren durch die Rührer nicht beschädigt werden.

⁺) Die Herstellung der Zelle besorgte Herr Lehmeier; für seine hilfsbereite Unterstützung in allen technischen Fragen möchte ich ihm an dieser Stelle danken.

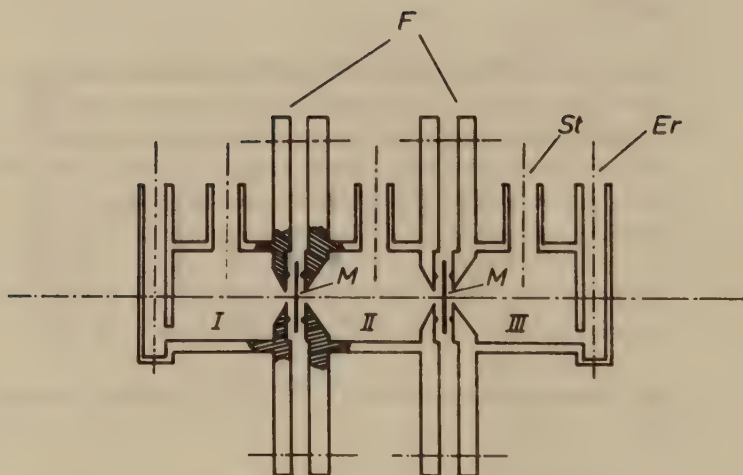


Abb. 2.6: Längsschnitt durch eine Dreikompartimentmeßzelle (schematisch): nach MENGES (36)

Querschnitt: zylindrisch

- F : Flanschen;
- St : Einfüllstutzen;
- Er : Elektrodenräume;
- M : Ionenaustauscher-Membranen;
- I : Meßkammer (Titrationslösung);
- II : Meßkammer (NaCl-Hämoglobin-Lösung);
- III: Meßkammer (Titrationslösung).

Material: Plexiglas

2.6.3 Titrationslösungen

Zur Herstellung dieser Lösungen, wie auch zu allen anderen, wurde demineralisiertes Wasser einer spezifischen Leitfähigkeit von etwa $10^{-7} \mu S cm^{-1}$ (bei $23^{\circ}C$) verwendet.

Die Titrationslösungen waren NaCl-Lösungen (NaCl MERCK; Reinheitsgrad: p.A.) mit Konzentrationen von 0,007 bis 0,70 Mol NaCl pro kg Wasser.

Der Fehler der durch Wägung eingestellten NaCl-Konzentrationen lag unter 0,1 %.

Alle Lösungen wurden in Polyäthylen-Flaschen bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt. Vor jeder Messung wurden die Lösungen dann auf Zimmertemperatur erwärmt.

2.6.4 Ionenaustauscher-Membranelektroden

Als Ionenaustauscher-Membranen wurden die Kationenaustauscher-Membran NEPTON CR-61 und die Anionenaustauscher-Membran NEPTON AR-111 der Firma IONICS, Watertown, Mass., USA, verwendet.

Die Kationenaustauscher-Membran besteht aus mit Divinylbenzol vernetztem Polystyrolsulfonat; sie trägt also SO_3^- -Festionen.

Die Anionenaustauscher-Membran besteht aus mit Divinyl-

benzol vernetztem Polystyrol mit ternären und quaternären Ammoniumbasen als Festionen. Die Konzentration dieser Festionen betrug beim Typ CR-61 4,12 und beim Typ AR-111 2,18 Äquivalent pro kg Wasser (45).

Zur mechanischen Festigung sind beide Membrantypen mit einem Stützgewebe aus "DYNEL" verstärkt. Die Dicke der Membranen beträgt etwa 0,7 mm, der Vernetzungsgrad ca. 30 %, wodurch sie für größere Proteinmoleküle, wie z. B. Hämoglobin, undurchlässig sind. Die Transportzahl für Wasser, bei Gleichgewicht der Membranen mit 0,1 m KCl-Lösung, beträgt ca. 8 Mole Wasser pro Faraday transportierter elektrischer Ladung (45). Die mittleren Coionenüberführungszahlen in den mit K^+ bzw. Cl^- beladenen Membranen beträgt bei Gleichgewicht mit 0,1 m KCl-Lösungen 0,03 bis 0,08 (45).

Vor dem Gebrauch wurden die Membranen mit Na^+ - bzw. Cl^- -Ionen beladen und anschließend je ein Membranpaar vor jeder Messung mit einer NaCl-Lösung etwa gleicher Konzentration wie die entsprechende Meßlösung äquilibriert. In diesen Lösungen wurden sie auch bei 4°C aufbewahrt.

2.6.5 KCl-Salzbrücken und Elektroden

In die Meßlösungen tauchten Borsilikatglas-Kapillaren ein, die mit 3 % Agar-Agar-Gel (DIFCO, purified agar) in gesättigter KCl-Lösung gefüllt waren. Vor dem Füllen wurden die Spitzen bis zu einem Innendurchmesser von 100 μm (45) ausgezogen und U-förmig umgebogen. Diese Maßnahme - u.a. - führte dazu, daß das Austreten von KCl in die Meßlösungen

durch Diffusion und Konvektion auf ein erträgliches Maß herabgesetzt wurde.

Um eine Verarmung an KCl in den Kapillaren zu vermeiden, wurden sie zwischen den Messungen in gesättigter KCl-Lösung aufbewahrt.

Die Salzbrücken zwischen den Glaskapillaren und den mit gesättigter KCl-Lösung gefüllten Vorratsgefäßen (siehe Abbildung 2.5) wurde durch gesättigte KCl-Lösung in Polyäthylen-Schläuchen mit einem Innendurchmesser von ca. 1 mm bewerkstelligt.

In die Vorratsgefäße tauchten Thalamid-Elektroden (siehe Abbildung 2.5) der Firma SCHOTT & GEN., Mainz, ein.

2.6.6 Elektrische Meßgeräte

Um die EMK der Meßzelle ermitteln zu können, mußte die Spannung zwischen den Thalamid-Elektroden praktisch stromlos gemessen werden. Daher wurde der Gleichspannungsmeßverstärker FHT 480 der Firma FRIESEKE & HOEPFNER, Erlangen, mit einem Eingangswiderstand von 10^{11} Ohm und einer Eingangskapazität von ca. 15 pF verwendet.

Alle EMK-Messungen wurden im 10 mV-Bereich des Anzeigeinstruments vorgenommen. Traten EMK-Werte über 10 mV auf, so wurde die Spannung am Ableseinstrument so weit mit dem

eingebauten Kompensator kompensiert, daß die Ablesung wieder im 10 mV-Bereich erfolgen konnte. Die Genauigkeit der Kompensationsspannungseinstellung betrug im ungünstigsten Falle $\pm 0,1$ mV.

Die am Ableseinstrument angezeigte Spannung wurde während des gesamten Meßvorgangs mit dem Kompensations-schreiber SERVOGOR der Firma METRAWATT, Nürnberg, registriert.

Die Ablesegenauigkeit der Schreiber-Anzeige im 10 mV-Bereich betrug $\pm 0,05$ mV. Zusammen mit der Genauigkeit der Einstellung der Kompensationsspannung ergab sich eine maximale Meßunsicherheit von $\pm 0,15$ mV.

2.6.7 Meßvorgang

Die beiden äußeren Kammern der Dreikompartiment-Meßzelle (siehe Abbildung 2.6) wurden mit der Titrationslösung, die mittlere Kammer mit der Hämoglobin-NaCl-Lösung gefüllt. Um Konzentrationsfehler zu vermeiden, wurde jede Kammer mit der entsprechenden Lösung vorher einmal gespült.

Während der Nulltitration für eine bestimmte Hämoglobin-NaCl-Lösung wurde diese in der mittleren Kammer belassen und nicht ausgetauscht. Nur jeweils nach der letzten Messung wurde neben der Titrationslösung auch die Hämoglobin-NaCl-Lösung ausgetauscht; der nun gemessene EMK-Wert wich nur gering vom unmittelbar vorher gemessenen Wert ab.

Außerdem wurden einige Messungen, bei denen bei jedem Wechsel der Titrationslösungen in den Außenkammern auch die Hämoglobin-NaCl-Lösung in der mittleren Kammer ausgetauscht wurde, durchgeführt. Die dabei gemessenen EMK-Werte waren innerhalb der Meßgenauigkeit gleich denen, die sich bei der zuerst beschriebenen Art der Messung ergaben.

Dies läßt den Schluß zu, daß während einer Nulltitration die Hämoglobin-NaCl-Lösung im Mittelkompartiment praktisch nicht durch Undichtigkeit der Kammern, durch Verdunstung oder durch Wasser- oder Ionentransport durch die Membranen verändert wird.

Nachdem die Agar-KCl-Elektroden in die Elektrodenräume (siehe Abbildung 2.5) eingebracht, die Rührstäbe in die Lösung eingetaucht und in Betrieb gesetzt waren, wurde die jeweilige Spannung registriert.

Das Rührwerk war auf eine Rührgeschwindigkeit eingestellt, bei der die schnellste Einstellung eines konstanten Spannungswertes erreicht wurde.

Bei der Ableitung der Gleichungen (2.10) und (2.11) in Abschnitt 2.1 war angenommen worden, daß zwischen den Lösungen und der Membranphase scharfe Grenzflächen bestehen, an denen elektrochemisches Gleichgewicht herrscht.

Genau genommen stellen jedoch die Flüssigkeitsfilme an den Membranen Übergangsschichten zwischen den Membranphasen und der angrenzenden Lösung dar, in denen sich die chemischen Potentiale und Transportzahlen kontinuierlich von ihren Werten in der Membran bis zu ihren Werten in der Lösung ändern.

Es kann gezeigt werden, daß der Absolutbetrag der EMK durch den Einfluß der Flüssigkeitsfilme gegenüber dem Wert bei scharfen Phasengrenzen erniedrigt wird. (45) Dieser Einfluß ist umso größer, je dicker die Flüssigkeitsfilme sind.

Durch Rühren der Lösungen kann nun die Dicke der Filmschichten an der Membran verringert werden. Daher wird der Absolutbetrag des sich einstellenden EMK-Wertes mit steigender Rührgeschwindigkeit zunehmen, was sich in einer Titrationsgerade mit größerer Steigung zeigt.

FFISTER (45) konnte theoretisch und experimentell nachweisen, daß der Schnittpunkt der Titrationsgeraden bei einer bestimmten Salzkonzentration in der Hämoglobinlösung mit der Geraden $E=0$ unabhängig von der Rührgeschwindigkeit und damit von der Steigung der Titrationsgeraden ist. Die Bestimmung von $(a_{+}')_{E=0}$ wird somit durch die Filmeffekte nicht verfälscht.

Durch die ungleiche Geometrie der Salzbrückenenden (Agar-KCl-Elektroden spitzen) und durch Unterschiede der beiden Thalamidelektroden ergab sich eine Asymmetriespannung von 0,3 - 0,7 mV, wenn beide Elektroden in die gleiche Lösung eintauchten. Um diese Asymmetriespannung zu eliminieren, wurden nach jeder Messung die Salzbrücken vertauscht und ein neuer Spannungswert gemessen. Da nur die Summe der Membranpotentiale, nicht jedoch das Asymmetriepotential seine Polarität bezüglich des Einganges des Meßverstärkers ändert, wurde durch Mittelwertbildung aus dem Absolutbetrag die tatsächlich vorhandene EMK errechnet.

Sämtliche Messungen wurden bei einer Temperatur von $23,1^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Da bei der Nulltitration zur Bestimmung

der Aktivitätskoeffizienten die Temperatur nur über die schwach temperaturabhängigen Aktivitätskoeffizienten in die Meßwerte eingehen, konnte auf eine Thermostatisierung verzichtet werden.

Um die gesuchte Aktivität von NaCl in einer Hämoglobin-NaCl-Lösung bestimmter NaCl-Konzentration zu erhalten, wurden Spannungswerte mit NaCl-Titrationslösungen verschiedener Konzentration gemessen, wobei der Konzentrationsbereich so gewählt wurde, daß die gemessene Spannung der Meßkette im Verlauf der Titration durch Null ging. Die gemessenen EMK-Werte wurden nun nach Eliminierung der Asymmetriespannung als Funktion des dekadischen Logarithmus der mittleren NaCl-Aktivität in der Titrationslösung aufgetragen (siehe Abbildung 2.7). Hierbei ergab sich immer eine lineare Abhängigkeit, also Geraden als Titrationskurven. Somit sind die Coionenüberführungszahlen und Wassertransportzahlen an den Membranen im untersuchten Bereich konzentrationsunabhängig (siehe Gleichung 2.14).

Es ergibt sich jedoch eine Abhängigkeit der Steigung der Titrationsgeraden von der NaCl-Konzentration in den Hämoglobin-NaCl-Lösungen: Da die Steigung von der Coionenüberführungszahl abhängig ist und die Coionenüberführungszahl mit steigender Salzkonzentration zunimmt, muß die Steigung der Titrationsgeraden mit zunehmender Salzkonzentration kleiner werden (siehe Abbildungen 2.7 bis 2.13).

Eine Beeinflussung der Steigung durch das Hämoglobin konnte nicht gefunden werden. Wie Tabelle 2.2 zeigt, sind die Steigungen der Titrationsgeraden bei Titration reiner NaCl-Lösungen (49) gleich denen bei Titration von Hämoglobin-NaCl-Lösung gleicher NaCl-Konzentration.

Der Schnittpunkt der Geraden $E=0$ mit der Titrationsgeraden ergibt den Meßwert $(a_{+}^{IV})_{E=0}$, der nach Gleichung (2.12) gleich der mittleren Aktivität von NaCl in der Hämoglobin-NaCl-Lösung ist.

Die Meßwerte $(a_{+}^{IV})_{E=0}$ wurden graphisch oder durch lineare Regression rechnerisch ermittelt.

Die mittleren statistischen Abweichungen der EMK-Werte von der Ausgleichgeraden betrugen durchschnittlich $\pm (0,31 \pm 0,16)$ mV. Daraus ergibt sich ein mittlerer Fehler in $(a_{+}^{IV})_{E=0}$ von $\pm 0,6$ % bis $0,9$ % (siehe auch Kapitel 5).

Die Reproduzierbarkeit der $(a_{+}^{IV})_{E=0}$ -Werte lag bei $\geq \pm 1,9$ % ($m_{\text{NaCl}} < 0,05$) bzw. $\leq \pm 0,8$ % ($m_{\text{NaCl}} > 0,05$).

Beispiele für Titrationsgeraden bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen sind in den Abbildungen 2.7 bis 2.13 dargestellt.

Die Genauigkeit der Methode wurde von RÄMISCH (49) mit reinen NaCl-Lösungen bekannter Aktivität geprüft. Die Abweichungen vom Sollwert betrugen im Mittel $0,7$ %, bei einer Reproduzierbarkeit der Meßwerte von $\pm 0,8$ %.

Tabelle 2.2: Vergleich der Steigungen von Titrationsgeraden mit reinen NaCl-Lösungen und mit Hämoglobin-NaCl-Lösungen gleicher NaCl-Konzentration im Mittelkompartiment.

m_{NaCl}	dE/d log $a_{\pm}$ (mV/Dekade)	
	ohne Hämoglobin (49)	mit 36,52%igem Hämoglobin im Mittelkompartiment
0,0102	115,1	116,1 $\pm$ 1,8
0,0307	-	113,4 $\pm$ 1,8
0,0513	-	110,6 $\pm$ 1,2
0,0718	-	108,6 $\pm$ 1,7
0,1025	105,3	105,1 $\pm$ 0,7
0,3073	-	87,6 $\pm$ 0,9
0,5171	77,2	77,1 $\pm$ 0,7

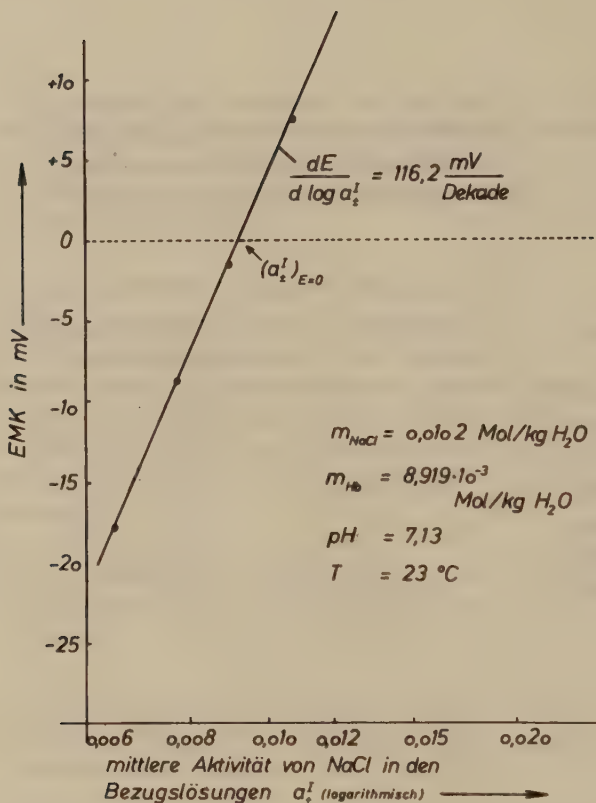


Abb. 2.7: Potentiometrische Nulltitration einer 36,52 Gew.-%igen (entsprechend $8,919 \cdot 10^{-3}$ Mol pro kg Wasser) Hämoglobin-NaCl-Lösung:

Elektromotorische Kraft der Meßzelle (EMK) in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der mittleren Aktivität von NaCl in der Aus-senkammer (Titrationslösung) ($a_{\pm}^I$)

Meßlösung: Hämoglobin-NaCl-Lösung bei pH = 7,1

$m_{\text{Hb}} = 8,919 \cdot 10^{-3} \text{ Mol pro kg Wasser}$

$m_{\text{NaCl}} = 0,0102 \text{ Mol pro kg Wasser}$

Kationenaustauscher-Membran: NEPTON CR-61

Anionenaustauscher-Membran: NEPTON AR-111

Temperatur: $23^\circ \text{C} \pm 1$

Steigung: 116,2 mV pro Dekade

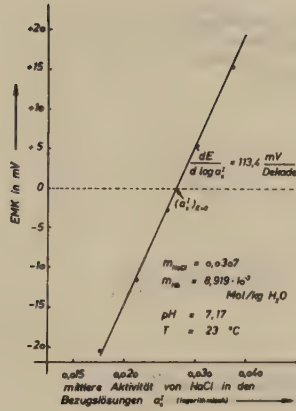


Abb. 2.8: Vergleiche Legende zu Abb. 2.7
 $m_{\text{NaCl}} = 0,0307$
 Steigung: 113,4 mV pro Dekade

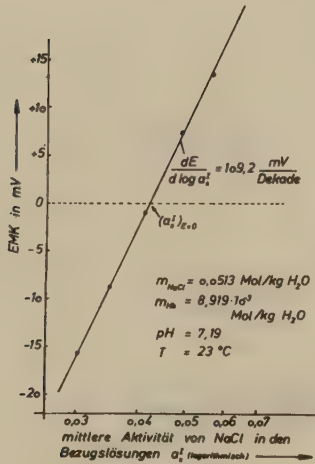


Abb. 2.9: Vergleiche Legende zu Abb. 2.7
 $m_{\text{NaCl}} = 0,0513$
 Steigung: 109,2 mV pro Dekade

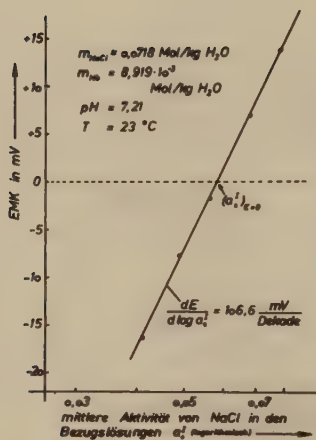


Abb. 2.10: Vergleiche Legende zu Abb. 2.7
 $m_{\text{NaCl}} = 0,0718$
 Steigung: 106,6 mV pro Dekade

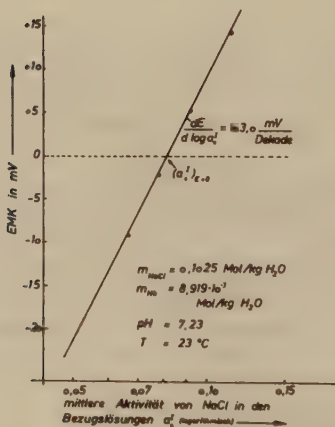


Abb. 2.11: Vergleiche Legende zu Abb. 2.7
 $m_{\text{NaCl}} = 0,1025$
 Steigung: 103,0 mV pro Dekade

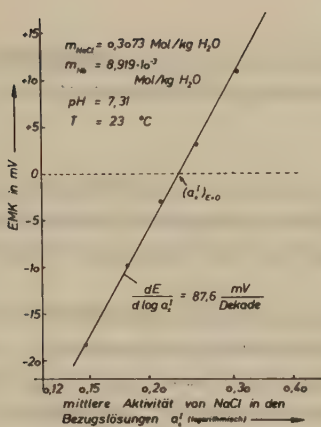


Abb. 2.12: Vergleiche Legende zu Abb. 2.7

$$m_{\text{NaCl}} = 0.3073$$

Steigung: 87,6 mV pro Dekade

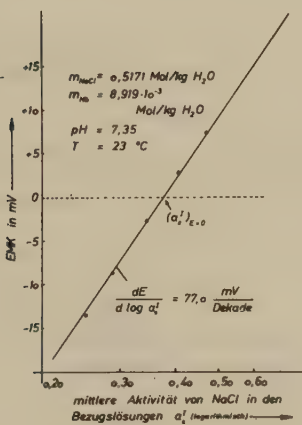


Abb. 2.13: Vergleiche Legende zu Abb. 2.7

$$m_{\text{NaCl}} = 0.5171$$

Steigung: 77,0 mV pro Dekade

2.7 Messung der pH-Werte in den Hämoglobin-NaCl-Lösungen
bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen

Neben den mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl wurde auch der pH-Wert der Hämoglobin-NaCl-Lösungen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration bestimmt.

Als Meßgerät diente das RADIOMETER-pH-Meter (Typ: 25 SE der Firma RADIOMETER, Kopenhagen).

Die Genauigkeit der Messung betrug $\pm 0,01$ pH-Einheiten.
(Siehe auch Abbildung 3.2 und Tabelle 3.2)

3

Ergebnisse

3.1

Stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizienten

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist es sinnvoll, den Einfluß von Protein-Polyionen auf das chemische Potential eines Salzes durch die Änderung des mittleren Aktivitätskoeffizienten des Salzes gegenüber dem Wert in einer reinen Salzlösung gleicher Konzentration zu beschreiben.

Den mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten von NaCl in Hämoglobin-NaCl-Lösungen erhält man über die Beziehung:

$$(a_{\pm})^2 = (\gamma_{\pm})^2 \cdot m_{+} \cdot m_{-} \quad (3.0)$$

Daraus ergibt sich bei Anwendung der Nulltitrationmethode mit Gleichung (2.12):

$$\gamma_{\pm}^H = \frac{(a_{\pm}^H)_{E=0}}{\sqrt{m_{+}^H \cdot m_{-}^H}} \quad (3.1)$$

wobei	γ_{+}^{II}	der mittlere Aktivitätskoeffizient von NaCl in der Hämoglobin-NaCl-Lösung,
	$(a_{+}^{IV})_{E=0}$	die mittlere Aktivität von NaCl in der Phase IV (reine NaCl-Lösung) bei der E gleich Null,
	m_{+}^{II}	die Konzentration der Natriumionen und
	m_{-}^{II}	die Konzentration der Chlorionen in der Hämoglobin-NaCl-Lösung in Mol pro kg Wasser ist.

Für diese Gleichung 3.1 sei noch angemerkt, daß im folgenden die Indizierung II der die Hämoglobin-NaCl-Lösung betreffenden Größen weggelassen wird, da sich alle diese Größen nur noch auf die Hämoglobin-NaCl-Lösung beziehen. Für a^{IV} wird jetzt a' geschrieben.

Bei der Berechnung wurde zunächst für die Na^{+} - und Cl^{-} -Konzentration die Einwaagekonzentration eingesetzt. Die so erhaltenen Werte werden als stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizienten bezeichnet. ⁺)

In Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse für den stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl in der Hämoglobin-NaCl-Lösung bei den verschiedenen NaCl-Konzentrationen angegeben.

⁺) Unter welchen Voraussetzungen dies nur erlaubt ist, und welche Konsequenzen damit verbunden sind, wird in Kapitel 4.1.1 genauer erläutert.

Zum Vergleich sind die mittleren Aktivitätskoeffizienten von reinen NaCl-Lösungen gleicher Konzentration, die aus Literaturwerten (13) durch graphische Interpolation erhalten wurden, aufgeführt.

Tabelle 3.1: Stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizienten von NaCl $\gamma_{\pm}$ (Mittelwerte aus jeweils 7 bis 10 Messungen) in einer 36,52 Gew.-%igen Hämoglobin-NaCl-Lösung bei verschiedenen NaCl-Einwaagekonzentrationen $m_{\pm}^{(o)}$, und der mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}^{(o)}$ von NaCl in einer reinen NaCl-Lösung (13):

$m_{\pm}^{(o)}$	$(a_{\pm}')_{E=0}$	$\gamma_{\pm}$	$\gamma_{\pm}^{(o)}$
0,0102	0,0092	$0,900 \pm 0,028$	0,900
0,0307	0,0262	$0,853 \pm 0,014$	0,848
0,0513	0,0424	$0,827 \pm 0,007$	0,818
0,0718	0,0583	$0,811 \pm 0,007$	0,796
0,1025	0,0816	$0,795 \pm 0,007$	0,774
0,3073	0,2304	$0,750 \pm 0,003$	0,708
0,5171	0,3737	$0,723 \pm 0,004$	0,679

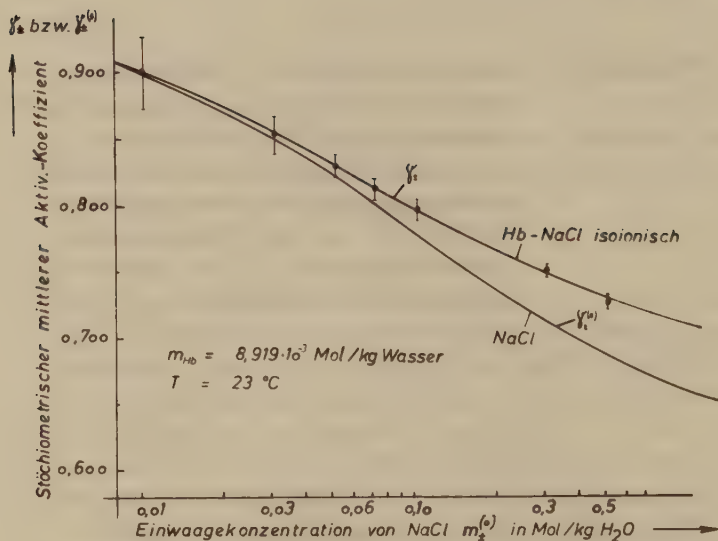


Abb. 3.1: Stöchiometrischer mittlerer Aktivitätskoeffizient von NaCl in einer isoionischen 36,52 Gew.-%igen Hämoglobin-NaCl-Lösung in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Einwaagekonzentration (obere Kurve, $\gamma_{\pm}$) und mittlerer Aktivitätskoeffizient von NaCl in einer reinen NaCl-Lösung in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Konzentration (untere Kurve, $\gamma_{\pm}^{(o)}$).

3.2 Ergebnisse der pH-Messung

Tabelle 3.2 und Abb. 3.2 zeigen den pH-Wert der Hämoglobin-NaCl-Lösungen in Abhängigkeit von der NaCl-Einwaagekonzentration $m_{+}^{(o)}$. Die Hämoglobinkonzentration betrug wie bei den Aktivitätsmessungen 36,52 Gew.-%.

Man erkennt einen deutlichen Anstieg des pH-Wertes mit steigender NaCl-Konzentration; er beträgt gegenüber dem pH-Wert von salzfreier Hämoglobinlösung gleicher Konzentration von 7,10 bis zu 0,25 pH-Einheiten bei einer NaCl-Konzentration von 0,5171 Mol pro kg Wasser.

Tabelle 3.2:

pH-Wert in den verschiedenen Hämoglobin-NaCl-Lösungen mit der entsprechenden NaCl-Einwaagekonzentration $m_{+}^{(o)}$:

$m_{+}^{(o)}$	pH
0,0000	7,10
0,0120	7,13
0,0307	7,17
0,0513	7,19
0,0718	7,21
0,1025	7,23
0,3073	7,31
0,5171	7,35

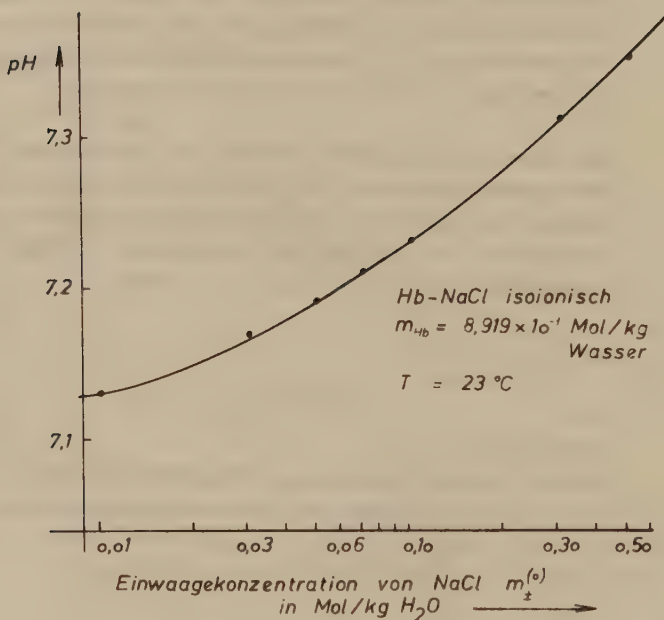


Abb. 3.2: pH-Wert in den verschiedenen Hämoglobin-NaCl-Lösungen in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Einwaagekonzentration in Mol pro kg Wasser (Hämoglobinkonzentration = 36,52 Gew.-%)

4 Diskussion

4.1 Modelle für die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten der Hämoglobin-NaCl-Lösung

Man kann nun eine Protein-Salzlösung mit mehreren Modellen hinsichtlich der Wechselwirkung ihrer einzelnen Komponenten untereinander beschreiben. In der hier verwendeten Lösung wären die einzelnen Komponenten Hämoglobinmoleküle, Natrium- und Chlorionen und Wassermoleküle, die teilweise in Hydroxyl- und Hydroniumionen dissoziiert sind.

Für jedes der nun folgend beschriebenen Modelle ergeben sich Konsequenzen hinsichtlich der Interpretation des stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten, der aus der Messung nach Gleichung 3.1 errechnet wurde.

Die einzelnen Komponenten treten untereinander in verschiedene Wechselwirkungen. Für diese Arbeit interessierte vor allem die wechselseitige Beeinflussung der einzelnen Komponenten durch die elektrostatischen Felder ihrer Ladungen und die stöchiometrische Bindung einzelner Komponenten untereinander, besonders die Bindung von Cl^- -Ionen und H_2O auf der Hämoglobinmoleküloberfläche.

Die Wahl der Modelle und ihre Diskussion erfolgte in Anlehnung an PAULY (43) und PFISTER (45).

4.1.1 Modell I: "Freie" Lösungskomponenten

In diesem Modell wird angenommen, daß das gesamte Wasser als Lösungsmittel für die Salzionen und die Hämoglobinmoleküle zur Verfügung steht. Außerdem werden alle Ionen als getrennte kinetische Einheiten betrachtet. (43, 45)

Das heißt, es werden weder Wassermoleküle noch Salzionen von den einzelnen Hämoglobinmolekülen gebunden. Ist dies der Fall, kann in Gleichung 3.1 für die Konzentration der Natrium- und Chlorionen die Einwaagekonzentration verwendet werden.

$$\begin{aligned} \text{Mit} \quad m_+ &= m_+^{(o)} & \text{und} \\ m_- &= m_-^{(o)} \end{aligned} \quad (4.1)$$

folgt

$$(\gamma_{\pm})_I = \frac{(a_{\pm}')_{E=0}}{\sqrt{m_+^{(o)} \cdot m_-^{(o)}}} \quad (4.2)$$

wobei $(\gamma_{\pm})_I$ stöchiometrischer mittlerer molaler Aktivitätskoeffizient von NaCl in einer Hämoglobin-NaCl-Lösung,

$(a_{\pm}')_{E=0}$ mittlere Aktivität von NaCl in reiner NaCl-Lösung, bei der $E = 0$,

- $m_+^{(o)}$ die Einwaagekonzentration von Natrium-
ionen und
- $m_-^{(o)}$ die Einwaagekonzentration von Chlor-
ionen in Mol pro kg Wasser ist.

Das ist der in Abschnitt 3.1 angegebene stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizient.

Die mittlere elektrische Ladungszahl z_{Hb} der Hämoglobinmoleküle ergibt sich aus der Elektroneutralitätsbedingung.

$$z_{Hb} m_{Hb} + z_+ m_+ + z_- m_- + z_{H^+} m_{H^+} + z_{OH^-} m_{OH^-} = 0, \quad (4.3)$$

wobei z die Ladungszahl der einzelnen Ionen-Komponenten in der Lösung darstellt,

m ihre Konzentration in Mol pro kg Wasser und die Indices $+$ und $-$ die Natrium- bzw. Chlorionen, der Index Hb die Hämoglobinmoleküle repräsentieren.

Daraus folgt:

$$\text{wegen } m_+ - m_- = 0 \quad (4.4)$$

$$\begin{aligned} \text{und } z_+ &= z_{H^+} = 1 \\ z_- &= z_{OH^-} = -1 \end{aligned} \quad (4.5)$$

$$z_{Hb} m_{Hb} + m_{H^+} - m_{OH^-} = 0; \quad (4.6)$$

d. h. die Nettoladung des Hämoglobinmoleküls wird durch das multiple Dissoziationsgleichgewicht von H^+ - und OH^- -Ionen bestimmt.

Legt man nun unseren gemessenen pH-Wert von 7,10 einer reinen 36,52 Gew.-%igen Hämoglobinlösung zugrunde, so kann die Nettoladung des Hämoglobinmoleküls berechnet werden.

Es gilt:

$$\begin{aligned}m_{H^+} &= 10^{-7.1} = 7,94 \cdot 10^{-8} \\m_{OH^-} &= 10^{-6.9} = 1,26 \cdot 10^{-7} \text{ und} \\(m_{OH^-} - m_{H^+}) &= 4,65 \cdot 10^{-8}\end{aligned}$$

Somit erhält man:

$$z_{Hb} = \frac{m_{OH^-} - m_{H^+}}{m_{Hb}} = 5,21 \cdot 10^{-6} \quad (4.7)$$

Die Nettoladung des Hämoglobinmoleküls nach Modell I ist somit praktisch gleich Null.

4.1.2 Modell II: Bindung von Wasser am Hb-Molekül

In diesem Modell wird angenommen, daß eine bestimmte Menge Wasser an das Hämoglobinmolekül gebunden ist. Dieses "gebundene Wasser" soll den Natrium- und Chlorionen nicht mehr als Lösungsraum zur Verfügung stehen. (15, 18, 19, 58) Es wird daher als "non solvent water" bezeichnet. Alle Ionen sollen "frei" sein, wie in Modell I angenommen wurde. Die Konzentration der "freien" Ionen im verbleibenden "freien" Wasser wird somit größer als die Einwaagekonzentration, die sich ja auf das Gesamtwasser bezieht.

In Gleichung 3.1 muß nun

$$\begin{aligned} m_+ &= m_+^{(w)} & \text{und} \\ m_- &= m_-^{(w)} & \text{eingesetzt werden,} \end{aligned} \quad (4.8)$$

wobei der Index w die durch die Wasserbindung korrigierten NaCl-Konzentrationen kennzeichnet.

Daraus folgt

$$(\gamma_{\pm})_{II} = \frac{(a_{\pm}')E=0}{\sqrt{m_+^{(w)} \cdot m_-^{(w)}}} \quad (4.9)$$

mit

$$m_+^{(w)} = \frac{m_+^{(o)}}{(1 - \eta m_{Hb})} \quad (4.10)$$

und

$$m_-^{(w)} = \frac{m_-^{(o)}}{(1 - \eta m_{Hb})} \quad (4.11)$$

wobei	$m_+^{(w)}$	die Natriumionenkonzentration in Mol pro kg "freies Wasser",
	$m_-^{(w)}$	die Chlorionenkonzentration in Mol pro kg "freies Wasser",
	$m_+^{(o)}$	die Einwaagekonzentration der Natriumionen,
	$m_-^{(o)}$	die Einwaagekonzentration der Chlorionen,
	η	die mittlere Menge "gebundenen Wassers" in kg pro Mol Hämoglobin und
	m_{Hb}	die Hämoglobinkonzentration in Mol pro kg Wasser ist.

Mit den Gleichungen (4.9) bis (4.11) ergibt sich für den für die Wasserbindung korrigierten stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten $(\gamma_{\pm})_{II}$:

$$(\gamma_{\pm})_{II} = \frac{(a_{\pm}')_{E=0}}{\sqrt{m_+^{(o)} \cdot m_-^{(o)}}} (1 - \eta m_{Hb}) \quad (4.12)$$

Mit Gleichung 4.2 erhält man:

$$(\gamma_{\pm})_{II} = (\gamma_{\pm})_I \cdot (1 - \eta m_{Hb}) \quad \text{oder} \quad (4.13)$$

$$(\gamma_{\pm})_I = (\gamma_{\pm})_{II} \cdot \frac{1}{(1 - \eta m_{Hb})} \quad (4.14)$$

Schreibt man nun formal:

$$(\gamma_{\pm})_w = \frac{1}{(1 - \eta m_{Hb})} \quad (4.15)$$

so erhält man schließlich:

$$(\gamma_{\pm})_{II} = \frac{(\gamma_{\pm})_I}{(\gamma_{\pm})_w} \quad (4.16)$$

$(\gamma_{\pm})_w$ beschreibt den Anteil am stöchiometrischen mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten, der durch die Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle mit Wasser bedingt ist. $(\gamma_{\pm})_{II}$ enthält dann nur noch die Wechselwirkungen der Salzionen untereinander, mit dem Wasser und mit den Hämoglobinmolekülen.

Die Nettoladung des Hämoglobinmoleküls z_{Hb} berechnet sich wie in Abschnitt 4.1.1 und ist wieder annähernd Null.

4.1.3 Modell III: Bindung von Ionen am Hb-Molekül

In diesem Modell soll im Mittel eine bestimmte Anzahl von Ionen spezifisch an jedes Hämoglobinmolekül gebunden werden und das Gesamtwasser wie in Modell I als "freies Wasser"

zur Lösung der einzelnen Komponenten zur Verfügung stehen.

$$\begin{aligned} \text{Mit } m_+ &= m_+^{(f)} & \text{und} \\ m_- &= m_-^{(f)} \end{aligned} \quad (4.17)$$

wobei $m_+^{(f)}$ die Konzentration der "freien" Natriumionen in Mol pro kg Gesamtwasser und $m_-^{(f)}$ die Konzentration der "freien" Chlorionen in Mol pro kg Gesamtwasser ist,

ergibt sich, eingesetzt in Gleichung (3.1), nun für den mittleren Aktivitätskoeffizienten:

$$(\gamma_{\pm})_{III} = \frac{(a_{\pm}')_{E=0}}{\sqrt{m_+^{(f)} \cdot m_-^{(f)}}} \quad (4.18)$$

Nimmt man an, daß nur eine Ionensorte spezifisch gebunden wird, folgt z. B. für die Bindung von Chlorionen (siehe Kap. 4.3).

$$\begin{aligned} m_+^{(II)} &= m_+^{(0)} \quad \text{und} \\ m_-^{(II)} &= m_-^{(0)} - \bar{v}_- \cdot m_{Hb} \end{aligned} \quad (4.19)$$

wobei $\bar{v}_-$ die mittlere Zahl der pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chlorionen darstellt.

Aus Gleichung (4.18) erhält man mit Gleichung (4.2):

$$(\gamma_{\pm})_{III} = \frac{(a_{\pm}^{\pm})_{E=0}}{\sqrt{m_+^{(0)} [m_-^{(0)} - \bar{v}_- \cdot m_{Hb}]}} = \quad (4.20)$$

$$= (\gamma_{\pm})_I \frac{1}{\sqrt{(1 - \bar{v}_- \cdot \frac{m_{Hb}}{m_-^{(0)}})}} = \frac{(\gamma_{\pm})_I}{(\gamma_{\pm})_V}$$

oder:

$$(\gamma_{\pm})_I = (\gamma_{\pm})_{II} \cdot (\gamma_{\pm})_V \quad (4.21)$$

mit

$$(\gamma_{\pm})_V = \sqrt{(1 - \bar{v}_- \cdot \frac{m_{Hb}}{m_-^{(0)}})} \quad (4.22)$$

Die Berücksichtigung der spezifischen Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül in der Ionenkonzentration bei der Berechnung führt also zum mittleren Aktivitätskoeffizienten $(\gamma_{\pm})_{III}$, der die Wechselwirkung der freien Salzionen untereinander, mit dem Wasser und den Hämoglobinmolekülen und der Hämoglobinmoleküle mit dem Wasser enthält.

$(\gamma_{\pm})_V$ kennzeichnet den Anteil am stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten, der durch die spezifische Bindung von Chlorionen an das Hämoglobinmolekül bedingt ist.

In diesem Modell ändert sich nun die Nettoladung des Hämoglobinmoleküls. Sie ist unter der Berücksichtigung der Abschätzung 4.7 praktisch gleich der Zahl der im Mittel gebundenen Ionen multipliziert mit deren Ladungszahl, also hier:

$$z_{Hb} = -\bar{v} \quad (4.23)$$

4.1.4 Modell IV: Bindung von Wasser und Ionen am Hb-Molekül

Man kann nun die Modelle II und III zu einem neuen Modell zusammenfassen. Dieses Modell scheint der Wirklichkeit am nächsten zu kommen: Zahlreiche Untersuchungen

haben gezeigt, daß Proteinmoleküle sowohl Wasser, als auch spezifisch Ionen binden. (55)

In diesem Modell werden vom Hämoglobinmolekül spezifisch Anionen und eine bestimmte Menge Wasser gebunden, das dann nicht mehr als Lösungsraum zur Verfügung steht ("gebundenes Wasser" als "non solvent water").

$$\begin{aligned} \text{Mit } m_+ &= m_+^{(w)} \quad \text{und} \\ m_- &= m_-^{(w,f)}, \end{aligned} \quad (4.24)$$

wobei $m_+^{(w)}$ die Natriumionenkonzentration
in Mol pro kg "freies Wasser"
und
 $m_-^{(w,f)}$ die Konzentration der "freien"
Chlorionen in Mol pro kg
"freies Wasser" ist,

ergibt sich, eingesetzt in Gleichung (3.2), für den mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten nach diesem Modell:

$$(\gamma_{\pm})_{IV} = \frac{(a_{\pm}')_{E=0}}{\sqrt{m_+^{(w)} \cdot m_-^{(w,f)}}} \quad (4.25)$$

Nach den Gleichungen (4.10), (4.11) und (4.19) gilt:

$$m_+^{(w)} = \frac{m_+^{(o)}}{(1 - \eta m_{Hb})} \quad (4.26)$$

$$m^{(w, f)} = \frac{m^{(o)}_+ \left(1 - \bar{v}_- \cdot \frac{m_{Hb}}{m^{(o)}_-}\right)}{(1 - \eta m_{Hb})} \quad (4.27)$$

und man erhält aus Gleichung (4.25):

$$(Y_z)_{IV} = \frac{(a'_z)_{E=0}}{\sqrt{\frac{m^{(o)}_+}{(1 - \eta m_{Hb})} \cdot \frac{m^{(o)}_+ \left(1 - \bar{v}_- \cdot \frac{m_{Hb}}{m^{(o)}_-}\right)}{(1 - \eta m_{Hb})}}} = \quad (4.28)$$

$$= \frac{(a'_z)_{E=0}}{\sqrt{m^{(o)}_+ \cdot m^{(o)}_-}} \cdot (1 - \eta m_{Hb}) \cdot \frac{1}{\left(1 - \bar{v}_- \cdot \frac{m_{Hb}}{m^{(o)}_-}\right)} =$$

$$= (Y_z)_I \cdot \frac{1}{(Y_z)_w} \cdot \frac{1}{(Y_z)_v} \quad (4.29)$$

Nach diesem Modell setzt sich der aus Aktivitätsmessungen unmittelbar zugängliche stöchiometrische mittlere molale Aktivitätskoeffizient $(\gamma_{\pm})_I$ aus drei Anteilen zusammen:

$$(\gamma_{\pm})_I = (\gamma_{\pm})_{IV} \cdot (\gamma_{\pm})_w \cdot (\gamma_{\pm})_v \quad (4.30)$$

$(\gamma_{\pm})_w$ bezeichnet den Anteil der Wasserbindung am Hämoglobinmolekül und $(\gamma_{\pm})_v$ den Anteil der spezifischen Ionenbindung am Hämoglobinmolekül.

$(\gamma_{\pm})_{IV}$ enthält nun nur noch die Wechselwirkung der Ionen untereinander, mit dem Wasser und mit den Hämoglobinmolekülen. ⁺) Diese Wechselwirkungen sind ganz überwiegend bedingt durch das elektrostatische Feld, dessen Quellen die Ionenladungen und die Ladungen auf den Hämoglobinmolekülen bilden. Daher wird $(\gamma_{\pm})_{IV}$ im folgenden als "elektrostatischer" mittlerer Aktivitätskoeffizient des Salzes $(\gamma_{\pm})_{el}$ bezeichnet:

$$(\gamma_{\pm})_{IV} \equiv (\gamma_{\pm})_{el} \quad (4.31)$$

Um aus dem direkt aus der Aktivitätsmessung erhaltenen stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten (siehe Kap. 3.1) den "elektrostatischen" mittleren

⁺) Bei der hier durchgeführten Ableitung wurde stillschweigend vorausgesetzt, daß die drei Effekte elektrostatische Wechselwirkung, Wasserbindung und spezifische Ionenbindung voneinander unabhängig sind, was, streng genommen, nicht zutrifft.

Aktivitätskoeffizienten erhalten zu können, müssen $(\gamma_{-})_w$ und $(\gamma_{+})_v$ aus unabhängigen Messungen der Wasserbindung und der spezifischen Ionenbindung am Proteinmolekül bekannt sein. Im Gegensatz - z. B. - zum Rinderserum-Albumin-Molekül liegen für das Hämoglobinmolekül in der Literatur nur Daten für die Wasserbindung, jedoch keine unabhängig gemessenen Daten über eine spezifische Ionenbindung vor. (15, 18, 19, 58)

Ohne weitere Annahmen lassen sich also aus den hier vorliegenden Messungen lediglich Aussagen über das Produkt $(\gamma_{-})_{el} \cdot (\gamma_{+})_v$, im folgendem als γ_{+}^{*} bezeichnet, gewinnen. Dazu muß - siehe Modell II - zunächst der Einfluß des am Hämoglobinmolekül gebundenen Wassers berücksichtigt werden.

4.2 Berücksichtigung der Protein-Wasser-Wechselwirkung

Im Allgemeinen erhält man für Proteine etwa 0,2 bis 0,5 Gramm "gebundenes Wasser" pro Gramm trockenes Protein. (1, 3, 5, 9, 14, 22, 48, 51)

Mit der Gleichung (4.15) kann der Anteil des stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten, der durch die Wasserbindung bedingt ist, errechnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Wert von 0,3 Gramm "gebundenes Wasser" pro Gramm trockenes Hämoglobin (d.h. $\eta = 19,35 \text{ kg/Mol Hb}$) angenommen.

Dieser Wert entspricht einem Wassermantel des kugelförmig gedachten Hämoglobinmoleküls von ein bis zwei Molekülschichten. (36)

Den für den Einfluß des am Hämoglobinmolekül gebundenen Wassers korrigierten mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}^*$ erhält man nach Gleichung (4.15) aus dem stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten nach der Beziehung:

$$\gamma_{\pm}^* \equiv (\gamma_{\pm})_A \cdot (\gamma_{\pm})_V \equiv \frac{\gamma_{\pm}}{(\gamma_{\pm})_W} = \frac{(a_{\pm}^*)_E=0}{m_{\pm}^{(0)}} (1 - \eta m_{HB}) \quad (4.32)$$

In Tabelle 4.1 sind die einzelnen $\gamma_{\pm}^*$ -Werte von NaCl in der Hämoglobin-NaCl-Lösung bei den verschiedenen NaCl-Konzentrationen zusammengefaßt.

In Abb. 4.1 sind diese $\gamma_{\pm}^*$ -Werte in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration aufgetragen.

Tabelle 4.1: Für die "Wasserbindung" des Hämoglobin-moleküls korrigierter stöchiometrischer mittlerer Aktivitätskoeffizient von NaCl in der 36,52 Gew.-%igen Hämoglobin-NaCl-Lösung $\gamma_{\pm}^*$ und mittlerer Aktivitätskoeffizient von NaCl in einer reinen NaCl-Lösung $\gamma_{\pm}^{(o)}$ (13) bei verschiedenen NaCl-Einwaagekonzentrationen $m_{\pm}^{(o)}$ in Mol pro kg Wasser.

$m_{\pm}^{(o)}$	$\gamma_{\pm}^{(o)}$	$\gamma_{\pm}^*$
0,0102	0,900	0,744 $\pm$ 0,023
0,0307	0,848	0,705 $\pm$ 0,011
0,0513	0,818	0,684 $\pm$ 0,006
0,0718	0,796	0,672 $\pm$ 0,005
0,1025	0,774	0,659 $\pm$ 0,006
0,3073	0,708	0,621 $\pm$ 0,003
0,5171	0,679	0,598 $\pm$ 0,003

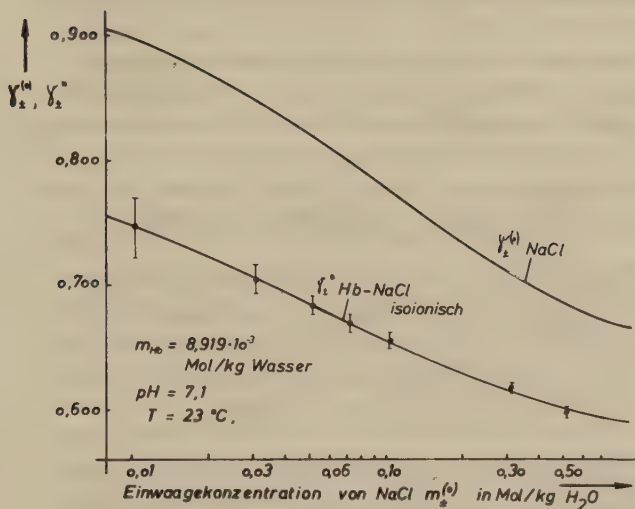


Abb. 4.1: Für die Wasserbindung am Hämoglobinmolekül korrigierter stöchiometrischer mittlerer Aktivitätskoeffizient von NaCl in einer 36,52 Gew.-%igen Hämoglobin-NaCl-Lösung in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Einwaagekonzentration (untere Kurve, $\gamma_{\pm}^{(0)}$) und mittlerer Aktivitätskoeffizient von NaCl in einer reinen NaCl-Lösung in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Konzentration (obere Kurve, $\gamma_{\pm}^{(H)}$) (NaCl-Konzentration in Mol pro kg Wasser)

$\gamma_{\pm}^*$ ist ein Maß für die Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle mit den Natrium- und Chlorionen durch das elektrostatische Feld des Hämoglobinmoleküls und/oder eine spezifische Bindung von Ionen an das Hämoglobinmolekül.

Im Gegensatz zum stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten (Abb. 3.1) liegt der mittlere Aktivitätskoeffizient des Salzes nach Berücksichtigung des Einflusses des am Hämoglobinmolekül gebundenen Wassers bei allen Salzkonzentrationen deutlich unter dem Wert in einer reinen NaCl-Lösung gleicher Konzentration: die Na^+ - und Cl^- -Ionen verhalten sich somit wie in reinen NaCl-Lösungen höherer Konzentration, in denen sie stärkeren Wechselwirkungen untereinander unterliegen.

Die Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten in der Hämoglobin-NaCl-Lösung gleicher Konzentration beträgt 17,0% bei einer NaCl-Einwaagekonzentration von 0,0102 Mol NaCl pro kg Wasser und nimmt monoton auf 11,9% bei 0,5171 Mol NaCl pro kg Wasser ab.

Eine getrennte Bestimmung von $(\gamma_{\pm})_{el}$ und $(\gamma_{\pm})_v$ aus den Meßergebnissen ist nicht möglich. Man kann jedoch durch Annahmen über eine der beiden Größen die andere jeweils aus den Meßwerten bestimmen.

So wird im folgendem vorgegangen (siehe dazu auch Gleichung 4.30).

4.3 Deutung der Meßergebnisse als elektrostatischen mittleren Aktivitätskoeffizienten

Durch die Annahme, daß keinerlei spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül erfolgt, somit $(\gamma_{\pm})_v$ gleich eins ist, folgt aus Gleichung (4.30) und (4.32):

$$\gamma_{\pm}^* = (\gamma_{\pm})_e = \frac{\gamma_e}{(\gamma_{\pm})_w} \quad (4.33)$$

Man könnte nun daran denken, daß die $\gamma_{\pm}^*$ -Werte (Tab. 4.1, Abb. 4.1) allein durch die Konzentrierung der freien NaCl-Lösung zwischen den Hämoglobinmolekülen durch das "non-solvent-water" und die dadurch bedingte Zunahme der elektrostatischen Wechselwirkungen der Na^+ - und Cl^- -Ionen untereinander zu erklären sei. Eine einfache Rechnung zeigt jedoch, daß dies nicht zutrifft: 0,3 g "non-solvent-water" in einer 36,52 Gew.-%igen Hämoglobinlösung bedingt eine Konzentrationserhöhung der freien Salzlösung zwischen den hydratisierten Hämoglobinmolekülen um 20,9%. Damit erhält man nach den Literaturwerten für reine NaCl-Lösungen bei den hier verwendeten Einwaagekonzentrationen die folgenden "korrigierten" mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}^{(o)}$:

Tabelle 4.2: Einwaagekonzentrationen für $\text{NaCl } m_{\pm}^{(o)}$, die dazugehörigen mittleren Aktivitätskoeffizienten in den reinen NaCl -Lösungen, $\gamma_{\pm}^{(o)}$ (13), und die "korrigierten" mittleren Aktivitätskoeffizienten in den Hämoglobin- NaCl -Lösungen entsprechender NaCl -Konzentration, $\gamma_{\pm}^{(o)'}$

$m_{\pm}^{(o)}$	$\gamma_{\pm}^{(o)}$	$\gamma_{\pm}^{(o)'}$
0,0102	0,900	0,893
0,0307	0,848	0,837
0,0513	0,818	0,807
0,0718	0,796	0,785
0,1025	0,774	0,763
0,3073	0,708	0,696
0,5171	0,679	0,671

Man erkennt, daß durch diese Korrektur lediglich eine Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten um maximal 1,7% zu erklären ist; im Durchschnitt bringt dieser Effekt weniger als 10 % der in Abb. 4.1 gezeigten Abnahme des mittleren Aktivitätskoeffizienten in den Hämoglobin- NaCl -Lösungen.

Die Konzentrationserhöhung von NaCl in der Hämoglobin- NaCl -Lösung durch die Wasserbindung an das Hämoglobinemolekül, und die dadurch bedingte Erhöhung der elektrostatischen Wechselwirkungen der kleinen Ionen untereinander reicht somit zur Erklärung der Ergebnisse für $\gamma_{\pm}^{*}$ nicht aus.

Daher muß ein direkter elektrostatischer Einfluß der Hämoglobinmoleküle auf die kleinen Ionen erwogen werden. Da aber die Bilanzladung des Hämoglobinmoleküls, wie schon in Abschnitt 4.1.1 errechnet, beim pH-Wert 7,1 praktisch gleich Null ist, ist die relativ starke Beeinflussung durch ein elektrisches Monopolfeld ausgeschlossen.

Wenn man davon ausgeht, daß die insgesamt etwa 100 positiven und 100 negativen Ladungsgruppen des Hämoglobinmoleküls gleichmäßig über die gesamte Oberfläche des Proteinmoleküls verteilt sind ⁺) und da das durch sie erzeugte elektrostatische Multipolfeld mit dem Abstand vom Hämoglobinmolekül sehr steil abfällt, kann von ihnen keine wesentliche elektrostatische Einwirkung auf die Natrium- und Chlorionen ausgehen.

Daraus kann man folgern, daß die Abnahme von ζ^+ von NaCl in Gegenwart von Hämoglobin (siehe Abb. 4.1) kaum durch die elektrostatischen Wechselwirkungen der Hämoglobinmoleküle auf die Salzionen bedingt sein kann.

⁺) Aus Messungen des elektrostatischen Dipolmoments des Hämoglobinmoleküls am isoelektrischen Punkt (37) läßt sich zeigen, daß die Gesamtdipolwirkung so groß ist, wie wenn nur zwei Prozent der etwa 200 positiven und negativen Ladungen an der Oberfläche des Moleküls zum Dipolmoment beitragen würden, was bedeutet, daß nahezu alle positiven und negativen Ladungsgruppen als gleichmäßig über die Moleküloberfläche verteilt angenommen werden müssen.

4.4 Deutung der Meßergebnisse durch die spezifische Bindung von Chlorionen am Hämoglobinmolekül

4.4.1 Berechnung von $(\gamma_{\pm})_V$ aus den Meßergebnissen

Die Betrachtung in Kapitel 4.3 führt zu der Annahme, daß der "elektrostatische" mittlere Aktivitätskoeffizient von NaCl in der Hämoglobin-NaCl-Lösung nahezu gleich dem mittleren Aktivitätskoeffizienten in einer reinen NaCl-Lösung gleicher Konzentration ist.

Somit ist

$$(\gamma_{\pm})_{el} = \gamma_{\pm}^{(o)} \quad (4.34)$$

Mit den Gleichungen (4.32) und (4.34) ergibt sich:

$$\gamma_{\pm}^* = \frac{\gamma_{\pm}}{(\gamma_{\pm})_w} = \gamma_{\pm}^{(o)} \cdot (\gamma_{\pm})_V \quad (4.35)$$

Die Veränderung von $\gamma_{\pm}^{*x}$ gegenüber dem Wert in reiner NaCl-Lösung $\gamma_{\pm}^{(o)}$, wird also hier allein durch die spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül gedeutet.

4.4.2 Diskussion der Ergebnisse der pH-Messung

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Bindung einwertiger Kationen in der Nähe des isoelektrischen Punktes von Proteinen so gut wie ausgeschlossen ist, eine spezifische Bindung einwertiger Anionen jedoch stattfindet, (55)

Beim Hämoglobin wurde bisher eine auffällige Bindung von Chlorionen am isoelektrischen Punkt noch nicht beobachtet. (2, 11)

Das Ergebnis der pH-Messung der Hämoglobin-NaCl-Lösungen verschiedener NaCl-Konzentrationen (siehe Kapitel 3.2) stützt jedoch die Annahme, daß auch Hämoglobin spezifisch Chlorionen bindet:

Durch die Bindung eines Chlorions an die Hämoglobinmoleküloberfläche werden die Dissoziationskonstanten der benachbarten dissoziablen Gruppen (COOH , NH_3^+) geändert. Die Bindung von H^+ -Ionen an diese Gruppen wird dadurch verstärkt und so über das Ionengleichgewicht des Wassers der pH-Wert erhöht.

Die beobachtete Zunahme des pH-Wertes von isoionischen Hämoglobin-NaCl-Lösungen läßt somit den Schluß zu, daß spezifisch Chlorionen vom Hämoglobin gebunden werden. Der pH-Wert

steigt mit der NaCl-Konzentration: je mehr Chlorionen in der Lösung vorhanden sind, desto mehr werden an das Hämoglobinmolekül gebunden, bis zur Absättigung der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen für Chlorionen auf dem Hämoglobinmolekül (siehe auch Tab. 4.4)

4.4.3 Berechnung der mittleren Zahl der gebundenen Chlorionen pro Hämoglobinmolekül aus den Ergebnissen der Messung des mittleren Aktivitätskoeffizienten

Die bisherigen Überlegungen und Abschätzungen und die Ergebnisse der pH-Messung lassen eine Deutung der Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl in der Hämoglobin-NaCl-Lösung durch eine spezifische Chlorionenbindung am Hämoglobinmolekül am plausibelsten erscheinen. Daher kann die Zahl der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chlorionen $\bar{\nu}_-$ aus den $\gamma_{\pm}^x$ - Werten errechnet werden.

Aus den Gleichungen (4.22) und (4.35) erhält man:

$$\bar{\nu}_- = \frac{m_{-}^{(o)}}{m_{Hb}} \cdot \left[1 - \left(\frac{\gamma_{\pm}^x}{\gamma_{\pm}^{(o)}} \right)^2 \right] \quad (4.36)$$

In Tabelle 4.3 sind die Meßergebnisse und errechneten Zwischenergebnisse, die zur Berechnung von $\bar{\nu}_-$ notwendig sind, zusammengefaßt.

Abbildung 4.2 zeigt die mittleren Bindungszahlen $\bar{y}_-$ von Chlorionen pro Hämoglobinmolekül in der Hämoglobin-NaCl-Lösung in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration in Mol pro kg Wasser (untere Kurve).

Tabelle 4.3: Zur Bestimmung der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chlorionen $\bar{y}_-$.

(Als Fehlergrenzen bei $\bar{y}_-$ sind die Werte angegeben, die sich aus der Standardabweichung der $y_{\pm}^*$ -Werte ergeben)

$m_{\pm}^{(o)}$	$y_{\pm}^{(o)}$	$y_{\pm}^*$	$(y_{\pm})_v = \frac{y_{\pm}^*}{y_{\pm}^{(o)}}$	$\frac{m_{Hb}}{m_{\pm}^{(o)}}$	$\bar{y}_-$
0,0102	0,900	0,747	0,830	0,871	$0,36 \pm 0,04$
0,0307	0,848	0,705	0,832	0,290	$1,06 \pm 0,07$
0,0513	0,818	0,684	0,836	0,174	$1,73 \pm 0,07$
0,0718	0,796	0,671	0,843	0,124	$2,33 \pm 0,09$
0,1025	0,774	0,658	0,850	0,087	$3,20 \pm 0,16$
0,3073	0,708	0,620	0,876	0,029	$8,00 \pm 0,25$
0,5171	0,679	0,598	0,880	0,017	$12,98 \pm 0,46$

4.4.4 Berechnung der mittleren Bindungszahl der Chlorionen pro Hämoglobinmolekül aus den Ergebnissen der pH-Messung

Nach TANFORD (57) gilt für eine isoionische Lösung folgende Beziehung zwischen der Zahl der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chlorionen ($\bar{v}'^+$) und der pH-Änderung gegenüber einer reinen Hämoglobinlösung - also ohne Salz:

$$\Delta pH = pH - (pH)_0 = +0,868 \cdot w \cdot \bar{v}'^+ \quad (4.37)$$

oder:

$$\bar{v}'^+ = \frac{\Delta pH}{0,868 \cdot w} \quad (4.38)$$

mit	$\bar{v}'^+$	Zahl der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chlorionen
	pH	pH-Wert der Hämoglobin-NaCl-Lösung
	$(pH)_0$	pH-Wert der reinen 36,52 Gew.-%igen Hämoglobinlösung

⁺) $\bar{v}'^+$ bezeichnet im folgenden die mittlere Zahl der pro Hb-Moleküle gebundenen Cl^- -Ionen, wie sie aus den pH-Messungen erhalten wird.

Der Faktor w in Gleichung (4.37) und (4.38) ist durch folgende Gleichung definiert:

$$w = \frac{\epsilon^2}{2 D R k T} \left(1 - \frac{\kappa \cdot R}{1 + \kappa \alpha} \right) \quad (4.39)$$

mit D Dielektrizitätskonstante des Wassers;
hier gleich 78,56,
 ϵ elektrische Elementarladung,
 k Boltzmann-Konstante,
 T absolute Temperatur; hier gleich 298 K,
 R Radius des hydratisierten Hämoglobinmoleküls,
 α geringst möglicher Abstand der Mittelpunkte
zwischen einem hydratisierten Hämoglobin-
molekül und einem hydratisierten Cl^- -Ion;
hier: $\alpha = R + 2,5$ (Å),
 κ reziproker Wert des DEBYE-HÜCKEL'schen
Radius des Ionenwolke; hier:

$$\kappa = \sqrt{\frac{8 \pi \epsilon^2 N_L}{1000 D k T} \cdot m_{\pm}^{(o)}} = \frac{\sqrt{m_{\pm}^{(o)}}}{3,04} \cdot 10^8 \text{ cm}^{-1} \quad (4.40)$$

N_L Loschmidt'sche Zahl.

Für den Radius des hydratisierten Hämoglobinmoleküls
berechnet sich mit dem Molekulargewicht von 64 500

der Dichte von trockenem Hämoglobin von $1,3 \text{ g/cm}^3$ und einer Hydrathülle von $0,3 \text{ g H}_2\text{O/g Hämoglobin}$ mit einer Dichte von $0,9 \text{ g/cm}^3$ (entspricht etwa der Dichte von Eis) ein Wert von $R = 30,4 \cdot 10^{-8} \text{ cm}$ ($= 30,4 \text{ Å}$).

Durch Einsetzen der Konstanten erhält man nach Berechnung der Werte für w für jede NaCl-Einwaagekonzentration aus der gemessenen pH-Verschiebung die Zahl der pro Hämoglobinemolekül im Mittel gebundenen Chlorionen. Die Ergebnisse der Berechnung von $\bar{v}'$ sind in Tabelle 4.4 und Abbildung 4.2 dargestellt. Zum Vergleich sind die aus den mittleren Aktivitätskoeffizienten berechneten $\bar{v}$ -Werte angegeben. Die Übereinstimmung kann, besonders angesichts der Grenzen der Genauigkeit der pH-Messung und der vereinfachten Annahmen, die der Auswertung der TANFORD'schen Theorie zugrunde liegen, als gut bezeichnet werden.

Ohne Korrektur für das am Hämoglobinemolekül gebundene Wasser als "non-solvent-water" hätten die $\gamma_{\pm}$ -Ergebnisse keine Interpretation als spezifische Ionenbindung erlaubt: wie aus Abbildung 3.1 ersichtlich, liegen die mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl in der Hämoglobin-NaCl-Lösung über den Werten für reine NaCl-Lösungen. Die formale Anwendung des Ionenbindungsmodells ohne Korrektur für "non-solvent-water" würde negative Bindungszahlen ergeben. Die gefundene pH-Verschiebung in isoionischen Hämoglobininlösungen bei Zugabe von Salz deutet aber klar auf die Bindung von Anionen durch das Hämoglobin hin.

Die gute Übereinstimmung der beiden Kurven in Abbildung 4.2 rechtfertigt somit auch nahezu quantitativ die "non-solvent-water"-Korrektur an den gemessenen $\gamma_{\pm}$ -Werten (vergleiche dazu aber Abschnitt 4.5).

Tabelle 4.4: Zur Bestimmung der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chlorionen aus den pH-Messungen $\bar{y}'$ und zum Vergleich die $\bar{y}$ -Werte, berechnet aus den mittleren Aktivitätskoeffizienten. Als Fehlergrenzen bei $\bar{y}'$ sind die Werte angegeben, die sich aus der Genauigkeit der pH-Messung von $\pm 0,01$ pH-Einheiten ergeben (siehe Abschnitt 5.3).

$m_{\pm}^{(o)}$	pH	$(pH)_o$	$pH-(pH)_o$	w	$\bar{y}'$	$\bar{y}$
0,0102	7,13	7,10	0,03	0,0607	$0,57 \pm 0,27$	$0,36 \pm 0,04$
0,0307	7,17	7,10	0,07	0,0464	$1,74 \pm 0,35$	$1,06 \pm 0,07$
0,0513	7,19	7,10	0,09	0,0404	$2,57 \pm 0,41$	$1,73 \pm 0,07$
0,0718	7,21	7,10	0,11	0,0367	$3,45 \pm 0,45$	$2,33 \pm 0,09$
0,1025	7,23	7,10	0,13	0,0332	$4,51 \pm 0,49$	$3,20 \pm 0,16$
0,3073	7,31	7,10	0,21	0,0244	$9,91 \pm 0,67$	$8,00 \pm 0,28$
0,5171	7,35	7,10	0,25	0,0213	$13,54 \pm 0,77$	$12,98 \pm 0,46$

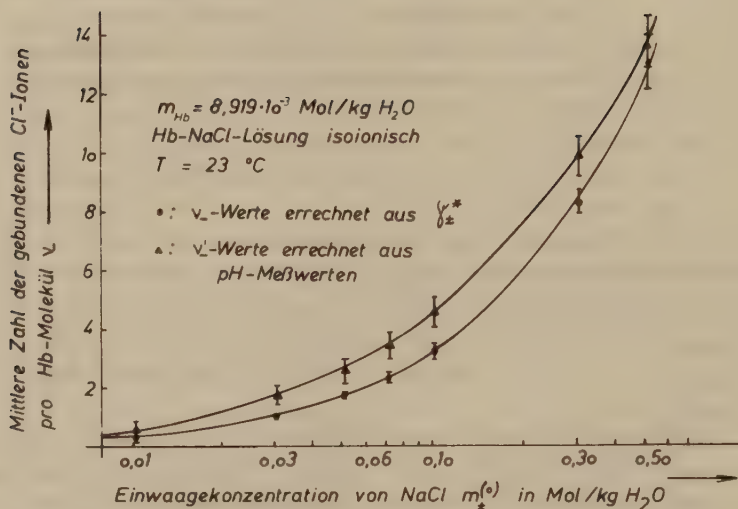


Abb. 4.2: Zahl der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chlorionen in der Hämoglobin-NaCl-Lösung in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Einwaagekonzentration in Mol pro kg Wasser, berechnet aus den Ergebnissen der pH-Messung (obere Kurve, ▲).

Zahl der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chlorionen in der Hämoglobin-NaCl-Lösung in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Einwaagekonzentration in Mol pro kg Wasser (untere Kurve, •), berechnet aus den Ergebnissen der Messung der mittleren Aktivitätskoeffizienten.

4.5 Anwendung der Theorie der multiplen Gleichgewichte auf die Ergebnisse für die Zahl der gebundenen Chlorionen

Unter der Annahme, daß jedes Hämoglobinmolekül n identische Bindungsstellen für Chlorionen besitzt, die untereinander nur durch elektrostatische Kräfte in Wechselwirkung treten, erhält man nach der Theorie von SCATCHARD (in TANFORD (57)) folgende Beziehung zwischen der Zahl der im Mittel gebundenen Chlorionen und der Aktivität a_- der "freien" Chlorionen in der Lösung:

$$\frac{\bar{v}_-}{n - \bar{v}_-} = K \cdot e^{2w\bar{v}_-} \cdot a_- \quad (4.41)$$

Dabei ist K die für alle n Bindungsstellen am Hämoglobinmolekül gleiche "intrinsische" Gleichgewichtskonstante der Reaktion:



Der Faktor $e^{2w\bar{v}_-}$ beschreibt den elektrostatischen Einfluß, den die elektrischen Ladungen von $\bar{v}_-$ bereits gebundenen Chlorionen auf die Stärke der Chlorionenbindung an das Hämoglobinmolekül ausüben. Der elektrostatische Wechselwirkungsparameter w ist durch Gleichung (4.39) gegeben.

Durch Umformung erhält man aus Gleichung (4.41):

$$\frac{\bar{v}_- \cdot e^{2w\bar{v}_-}}{a_-} = K_n - K\bar{v}_- \quad (4.42)$$

Trägt man nun den Ausdruck auf der linken Seite von Gleichung (4.42) als Funktion von $\bar{v}_-$ auf, so müßte sich bei Gültigkeit der getroffenen Annahmen eine Gerade ergeben, aus deren Steigung ($-K$) und Ordinatenabschnitt (K_n) sich die Bindungskonstante K und die Zahl der Bindungsstellen n bestimmen lassen.

Die Tabellen 4.4 und 4.5 und die Abbildung 4.3 zeigen die Ergebnisse der Anwendung von Gleichung (4.42) auf die in den Kapiteln 4.2 und 4.3 aus den mittleren Aktivitätskoeffizienten und aus den pH-Verschiebungen berechneten $\bar{v}_-$ - bzw. $\bar{v}'_-$ -Werte.

Für die Aktivität der freien Chlorionen der Lösung wurde der Wert

$$a_- = m_-^{(f)} \cdot \gamma_- = \gamma_- \cdot (m_-^{(o)} - \bar{v}_- \cdot m_{Hb}) \quad (4.43)$$

mit	$m_-^{(f)}$	Konzentration der "freien" Chlorionen in Mol pro kg Gesamtwasser,
	$m_-^{(o)}$	Einwaagekonzentration der Chlorionen in Mol pro kg Gesamtwasser und
	γ_-	Aktivitätskoeffizient der "freien" Cl^- -Ionen,

eingesetzt.

Als Aktivitätskoeffizient γ_- der "freien" Chlorionen (als Coionen der HbCl_2 -Polyionen) wurde der Wert in einer reinen NaCl-Lösung gleicher Einwaagekonzentration verwendet, der nach der GUGGENHEIM-Konvention ⁺) gleich dem mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}^{(o)}$ dieser Lösung ist: Näherungsweise kann angenommen werden, daß der Aktivitätskoeffizient der Coionen in einer Polyelektrolytlösung nicht verändert wird (vgl. Diskussion der Coionen-Aktivitätskoeffizienten in (45)).

Abbildung 4.3 zeigt, daß die Ergebnisse aus der pH-Messung sich innerhalb der Fehlergrenzen gut als Gerade nach Gleichung (4.42) darstellen lassen. Aus Steigung und Ordinatenabschnitt erhält man für die Bindungskonstante den Wert von 4,7 und für die Zahl der Bindungsstellen den Wert von 32,5.

Die Ergebnisse aus den $\gamma_{\pm}$ -Messungen ergeben dagegen in der Darstellung von Abbildung 4.3 nicht nur keine Gerade, sondern zeigen darüber hinaus mit steigendem $\bar{v}_-$ monoton ansteigende Werte des Ausdrucks auf der linken Seite von Gleichung (4.42). Außerdem liegen alle diese Werte, entsprechend den niedrigeren $\bar{v}_-$ -Werten, zum Teil erheblich unter den aus ΔpH berechneten. Dieser Befund scheint zunächst einer Interpretation der $\gamma_{\pm}^*$ -Ergebnisse als spezifische Ionenbindung zu widersprechen. Folgende Überlegungen zeigen jedoch, daß dieser Widerspruch erklärt werden kann.

⁺) Nach der GUGGENHEIM-Konvention gilt für (1,1)-Elektrolyte: $\gamma_{\pm}^{(o)} = \gamma_+^{(o)} = \gamma_-^{(o)}$. (21)

Zunächst ist zu bedenken, daß die $\bar{V}_-$ -Werte aus der γ_+^* -Messung, im Gegensatz zu denen aus ΔpH , eine Korrektur für "non-solvent-water" enthalten. Bei der Berechnung wurde für die Menge des "gebundenen" Wassers pro Hämoglobinmolekül der Wert von 0,3 g pro Gramm trockenes Hämoglobin verwendet. Dieser Wert entspricht einem mittleren Wert der zahlreichen, mit unterschiedlichen Methoden bestimmten Menge des "gebundenen" Wassers in Hämoglobin- und anderen Proteinlösungen. Als quantitativ "richtiger" Wert für das tatsächlich als "non-solvent-water" wirkende "gebundene" Wasser kann er jedoch nicht angesehen werden. Die insgesamt niedriger liegenden $\bar{V}_-$ - und $\bar{V}_e^{2w\bar{V}}/a_-$ -Werte - verglichen mit denen aus ΔpH gewonnenen Werten - lassen vermuten, daß eine größere Menge als "non-solvent-water" anzusetzen ist, als bei der Berechnung geschehen.

Der Anstieg von $\bar{V}_e^{2w\bar{V}}/a_-$ mit $\bar{V}_-$, zum anderen, deutet darauf hin, daß in γ_+^* und damit in $\bar{V}_-$ ein nicht auf spezifischer Bindung beruhender Effekt des Proteins auf die Salzionen enthalten ist, der γ_+^* zusätzlich erniedrigt und daher zu zu hohen $\bar{V}_-$ - und $\bar{V}_e^{2w\bar{V}}/a_-$ -Werten führt.

Dieser Effekt kann in einer elektrostatischen Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle mit den Salzionen bestehen: Mit zunehmender NaCl-Konzentration werden immer mehr Chlorionen am Hämoglobinmolekül gebunden; die elektrostatische Nettoladung des Hämoglobinmoleküls wird daher immer negativer und um das Hämoglobinmolekül herum baut sich ein elektrostatisches Feld auf, das die Salzionen in der "freien" Lösung zwischen den Proteinmolekülen beeinflusst. Mit zunehmender NaCl-Konzentration sollte sich daher eine zunehmende zusätzliche Erniedrigung

des mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl bemerkbar machen, wie auch das Ansteigen der $\bar{V}_e^{2w\bar{V}}/a_-$ Werte mit steigendem $\bar{V}_-$ zeigt.

Im folgenden Abschnitt wird versucht, aus einem quantitativen Vergleich der beiden Kurven in Abbildung 4.3 den elektrostatischen Anteil am mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl in der Hämoglobin-NaCl-Lösung abzuschätzen.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Anwendung von Gleichung (4.42) auf die im Kapitel 4.2 aus dem mittleren Aktivitätskoeffizienten berechneten $\bar{v}_-$ -Werte.

$m_{\pm}^{(o)}$	$\bar{v}_-$	$m_{\pm}^{(f)}$	$\gamma_{\pm}^{(o)}$	e^{2wv_-}	$\bar{v}_- \cdot e^{2w\bar{v}_-} / \gamma_{\pm}^{(o)} \cdot m_{\pm}^{(f)}$
0,0102	0,36	0,00703	0,900	1,0447	59,5
0,0307	1,06	0,02128	0,848	1,1034	64,8
0,0513	1,73	0,03583	0,818	1,1500	67,9
0,0718	2,33	0,05104	0,796	1,1865	68,1
0,1025	3,20	0,07400	0,774	1,2367	69,1
0,3073	8,00	0,23600	0,708	1,4776	70,7
0,5171	12,98	0,40133	0,679	1,7384	82,7

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Anwendung von Gleichung (4.42) auf die im Kapitel 4.3 aus den pH-Verschiebungen berechneten $\bar{v}_-$ -Werten.

$m_{\pm}^{(o)}$	$\bar{v}_-$	$m_{\pm}^{(f)}$	$\gamma_{\pm}^{(o)}$	e^{2wv_-}	$\bar{v}_- \cdot e^{2w\bar{v}_-} / \gamma_{\pm}^{(o)} \cdot m_{\pm}^{(f)}$
0,0102	0,57	0,00516	0,900	1,0716	140,1
0,0307	1,74	0,01522	0,848	1,1510	155,4
0,0513	2,57	0,02835	0,818	1,2308	136,4
0,0718	3,45	0,04105	0,796	1,2882	136,0
0,1025	4,51	0,06227	0,774	1,3491	126,2
0,3073	9,91	0,21890	0,708	1,6219	103,7
0,5171	13,54	0,39630	0,679	1,7803	89,5

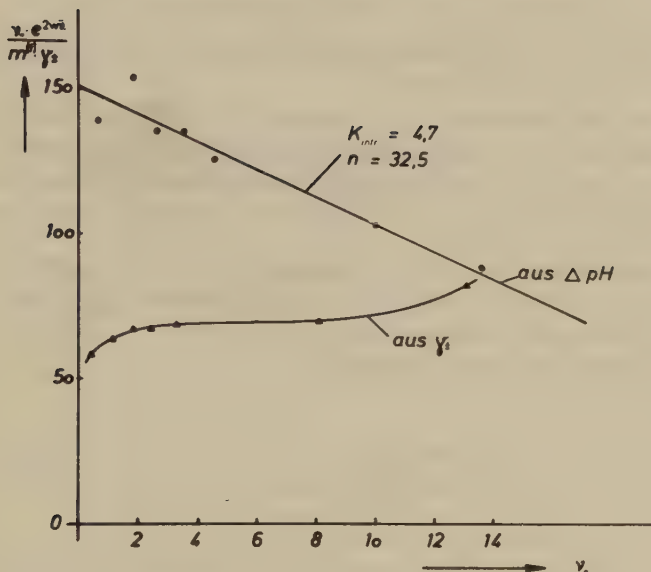


Abb. 4.3: $\frac{\bar{v}_{\pm}^{(o)} \cdot e^{2w\bar{v}_{\pm}}}{m_{\pm}^{(f)} \cdot \gamma_{\pm}^{(o)}}$ in Abhängigkeit von $\bar{v}_{\pm}$,

einmal errechnet aus dem mittleren Aktivitätskoeffizienten (untere Kurve) und aus den pH-Verschiebungen (obere Kurve).

Die Steigung $K_{intr.}$ der oberen Kurve ist nach Gleichung (4.42) gleich 4,7, der Ordinatenabschnitt K_n ist gleich 152,75, woraus sich die Zahl der Bindungsstellen n gleich 32,5 ergibt.

4.0 Abschätzung des elektrostatischen Anteils an mittleren Aktivitätskoeffizienten

Für diese Abschätzung wird von folgenden Annahmen auszugehen sein:

- (a) die Ergebnisse aus der pH-Messung liefern die "richtigen" $\bar{\gamma}_{\pm}$ -Werte ($\bar{\gamma}_{\pm}^0$)*
- (b) bei der niedrigsten NaCl-Konzentration ($m_{NaCl} = 0,001$) und daher auch niedrigsten Ladung des Hämoglobinsmoleküls ($\lambda_{Hb} = -\bar{\gamma}_{\pm}^0 = -0,67$) hat das elektrostatische Einflüß der Hämoglobinsmoleküle auf die Kationen zu vernachlässigen.

Nach Annahme (a) läßt sich entsprechend den Gleichungen (4.14) und (4.22) mit $\bar{\gamma}_{\pm}^0$ der Anteil $(\gamma_{\pm}^0)^0$ an mittleren Aktivitätskoeffizienten des Salzes berechnen, der nur auf die spezifische Chlorionenbindung zurückgeht:

$$(\gamma_{\pm}^0)^0 = \gamma_{\pm}^0 \left(1 - \frac{\lambda_{\pm}^0}{\lambda_{\pm}^0} \right) = \gamma_{\pm}^0 \left(\gamma_{\pm}^0 \right)_{\text{Cl}} \quad (4.24)$$

* Streng genommen weichen die gemessenen pH-Wertangaben von den "theoretischen", durch die Verschiebung des Wasserstoffgleichgewichts nach Cl-Bindung an den H-Molekülen bedingten Werten ab. Durch die Folge der Cl-Bindung nimmt eine negative Nettoladung der H-Moleküle kommt es zu einer Verschiebung der Übertragungskonstanten des Gleichgewichts hin zu den H-NaCl-Lösung, die zu einer Veränderung des Diffusionskoeffizienten $\lambda_{\pm}^0$ der Referenzelektrode bei der pH-Messung führt. Das Ergebnis ist eine systematische, mit zunehmender Nettoladung der H-Moleküle zunehmende Abweichung der gemessenen pH-Werte von den "theoretischen" Werten. Diese Abweichung beträgt bei den vorliegenden Messungen und Abschätzungen (11) mit der Hilfe durch den Diffusionskoeffizienten $\lambda_{\pm}^0$ der H-Moleküle im vorliegenden Fall jedoch zu negativen $\lambda_{\pm}^0$ -Werten führen, deren Absolutwerte nicht wegen der relativ niedrigen Nettoladung der H-Moleküle bei gleichzeitig relativ hohen $\lambda_{\pm}^0$ -Werten der H-NaCl-Lösungen Klasse gegenüber den gemessenen $\lambda_{\pm}^0$ -Werten sein dürfte, was diese Abweichung nicht den Verlauf des Diffusionskoeffizienten auf die $\bar{\gamma}_{\pm}^0$ -Werte zurückzuführen.

Nach Annahme (b) und Gleichung (4.32) liefert der Quotient aus dem stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}^*$ und $(\gamma_{\pm}^*)'$ bei der niedrigsten NaCl-Konzentration den "richtigen" Anteil $(\gamma_{\pm})'_w$ am stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten, der durch "non-solvent-water" bedingt ist:

$$\frac{\gamma_{\pm}}{(\gamma_{\pm}^*)'} = \frac{(\gamma_{\pm})'_{el} \cdot (\gamma_{\pm})'_v \cdot (\gamma_{\pm})'_w}{\gamma_{\pm}^{(o)} \cdot (\gamma_{\pm})'_v} = (\gamma_{\pm})'_w \quad (4.45)$$

für $m_{\pm}^{(o)} = 0,0102$,
wegen:

$$(\gamma_{\pm})'_{el} = \gamma_{\pm}^{(o)} \quad (4.46)$$

für $m_{\pm}^{(o)} = 0,0102$ nach Annahme (b).

Die Berechnung ergibt:

$$(\gamma_{\pm})'_w = \frac{0,900}{0,639} = 1,408$$

und mit Gleichung (4.15) für die Menge des "non-solvent-water" pro Hämoglobinmolekül einen Wert von $\eta' = 33,1$ kg Wasser pro Mol Hämoglobin, entsprechend 0,51 Gramm "gebundenes" Wasser pro Gramm Hämoglobin.

Führt man mit diesem Wert für das "non-solvent-water" die in Abschnitt 4.2 beschriebene Korrektur des mittleren

Aktivitätskoeffizienten durch, so erhält man mit

$$(\gamma_{\pm})'' = \frac{\gamma_{\pm}}{(\gamma_{\pm})_a} = (\gamma_{\pm})'_s (\gamma_{\pm})'_v \quad (4.47)$$

den mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl, der den Einfluß der spezifischen Chlorionenbindung nach den Ergebnissen der Δp_H -Messung und des elektrostatischen Feldes der durch die Chlorionenbindung negativ geladenen Hämoglobinmoleküle enthält. Aus den Gleichungen (4.44) und (4.47) ergibt sich der elektrostatische Anteil am mittleren Aktivitätskoeffizienten zu:

$$(\gamma_{\pm})'_s = \gamma_{\pm}^{(0)} \frac{(\gamma_{\pm})''}{(\gamma_{\pm})'} \quad (4.48)$$

Die Ergebnisse der Berechnung sind in Tabelle 4.7 und Abbildung 4.4 angegeben.

Man erkennt, daß mit der NaCl-Konzentration zunehmenden Einfluß des elektrostatischen Feldes der $\text{Hb}(\text{Cl})^{-1/2}$ -Moleküle auf die Salzlösung. Ab einer NaCl-Konzentration von etwa 0,4 Mol pro kg Wasser überwiegt der elektrostatische Anteil an der Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten den der spezifischen Ionenbindung, während die NaCl-Konzentrationen bis 0,4 Mol pro kg Wasser der Anteil der spezifischen Ionenbindung mehr als 75 % des Effektes ausmacht.

Wie Tabelle 4.8 zeigt, stimmt die prozentuale Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl in einer 50,0 Gew.-%igen technischen Hämoglobinslösung

nach Korrektur für "non-solvent-water" nach der vorliegenden Abschätzung von etwa 30 % bei 0,01 Mol NaCl pro kg Wasser geringfügig ab auf etwa 25 % bei 0,5 Mol NaCl pro kg Wasser. Die Erniedrigung von $\gamma_{\pm}$ durch das elektrostatische Feld der $\text{Hb}(\text{Cl}^-)_V$ -Moleküle ist zwar insgesamt geringer, nimmt jedoch im gleichen Salzkonzentrationsbereich zu.

Die beschriebenen Ergebnisse stimmen qualitativ gut mit den Ergebnissen von RÄMISCH (49) überein, der in isotonischen NaCl-Rinderserumalbumin-Lösungen bei einer Proteinkonzentration von 20 Gew.-% und NaCl-Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 Mol pro kg Wasser elektrostatische mittlere Aktivitätskoeffizienten von NaCl fand, die um 3 % (bei 0,01 m NaCl, $\bar{\gamma}_{\text{RSA}} = -\bar{V}_- = -2$) bis 8 % (bei 0,5 m NaCl, $\bar{\gamma}_{\text{RSA}} = -\bar{V}_- = -15$) niedriger lagen als in reinen NaCl-Lösungen, wenn man seine Ergebnisse auf 0,51g "non-solvent-water" pro g RSA umrechnet.

Tabelle 4.7: Zwischenergebnisse und Ergebnis der Abschätzung des elektrostatischen Anteils am mittleren Aktivitätskoeffizienten mit den aus der Δ pH-Messung ermittelten $\bar{\gamma}_{\pm}'$ -Werten.

$m_{\pm}^{(o)}$	$\bar{\gamma}_{\pm}'$	$\gamma_{\pm}^{(o)}$	$\gamma_{\pm}$	$(\gamma_{\pm}^*)'$	$(\gamma_{\pm}^*)''$	$(\gamma_{\pm}')_{el}$
0,0102	0,57	0,900	0,900	0,639	0,639	0,900
0,0307	1,74	0,848	0,853	0,597	0,603	0,857
0,0513	2,57	0,818	0,827	0,608	0,585	0,788
0,0718	3,45	0,796	0,811	0,602	0,574	0,759
0,1025	4,51	0,774	0,795	0,603	0,563	0,723
0,3073	9,91	0,708	0,750	0,598	0,531	0,628
0,5171	13,54	0,679	0,723	0,594	0,512	0,585

Tabelle 4.8: Prozentuale Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl ($\gamma_{\pm}^*$)' nach der in Abschnitt 4.6 vorgenommenen Korrektur für "non-solvent-water" und die prozentuale Erniedrigung von $\gamma_{\pm}^*$ durch das elektrostatische Feld der $Hb(Cl^-)_V$ -Moleküle.

$m_{\pm}^{(o)}$	$\frac{[(\gamma_{\pm}^*)'' - \gamma_{\pm}^{(o)}]}{\gamma_{\pm}^{(o)}} \cdot 100$	$\frac{[(\gamma_{\pm}')_{el} - \gamma_{\pm}^{(o)}]}{\gamma_{\pm}^{(o)}} \cdot 100$
0,0102	- 29,0 %	0,0 %
0,0307	- 28,9 %	+ 1,1 %
0,0513	- 28,5 %	- 3,7 %
0,0718	- 27,9 %	- 4,6 %
0,1025	- 27,3 %	- 6,6 %
0,3073	- 25,0 %	- 11,3 %
0,5171	- 24,6 %	- 13,8 %

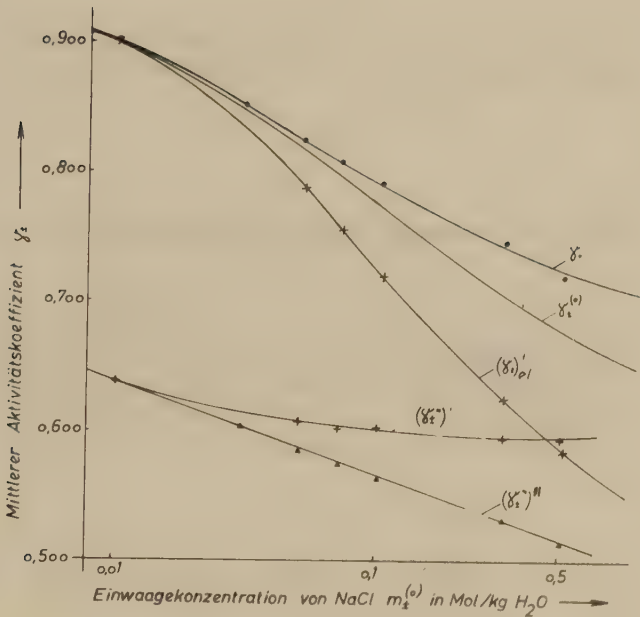


Abb. 4.4: In Tabelle 4.6 aufgeführte und in Abschnitt 4.6 erläuterte mittlere Aktivitätskoeffizienten in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der NaCl-Einwaagekonzentration.

- Mit: $\gamma_{\pm}^{(o)}$ Aktivitätskoeffizient von NaCl in reinen NaCl-Lösungen,
- $\gamma_{\pm}$ stöchiometrischer mittlerer Aktivitätskoeffizient,
- $(\gamma_{\pm}')'$ Anteil des mittleren Aktivitätskoeffizienten, der nur auf die spezifische Cl^- -Ionenbindung zurückgeführt wird, errechnet aus ΔpH ,
- $(\gamma_{\pm}'')''$ mittlerer Aktivitätskoeffizient, der den Einfluß der spezifischen Cl^- -Ionenbindung und des elektrostatischen Feldes der negativ geladenen Hb-Moleküle und
- $(\gamma_{\pm}')'_{el}$ elektrostatischer Anteil am mittleren Aktivitätskoeffizienten.

5 Fehlerbetrachtung

5.1 Mittlerer Fehler des mittleren Aktivitätskoeffizienten

Nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz ergibt sich aus der Bestimmungsgleichung (4.32) für den "theoretischen" relativen mittleren Fehler des mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}^*$:

$$\frac{\delta \gamma_{\pm}^*}{\gamma_{\pm}^*} = \sqrt{\left[\frac{\delta (a'_{\pm})_{E=0}}{(a'_{\pm})_{E=0}} \right]^2 + \left[\frac{\delta m_{\pm}^{(o)}}{m_{\pm}^{(o)}} \right]^2 + \left[\frac{\eta m_{H_2O}}{1 - \eta m_{H_2O}} \right]^2 \left[\frac{\delta m_{H_2O}}{m_{H_2O}} \right]^2} \quad (5.1)$$

$\frac{\delta (a'_{\pm})_{E=0}}{(a'_{\pm})_{E=0}}$ wird im wesentlichen bestimmt durch die mittlere statistische Abweichung δE der EMK-Werte von der Ausgleichsgeraden. Nach Gleichung (2.12) ergibt sich:

$$\frac{\delta (a'_{\pm})_{E=0}}{(a'_{\pm})_{E=0}} = \frac{2,303 \cdot \delta E}{A} \quad (5.2)$$

wobei A die Steigung der Titrationsgeraden bedeutet.

Mit den Werten für A zwischen 77 und 116 mV/Dekade (siehe Seite 47) und $E = \pm 0,31$ mV (siehe Seite 46) erhält man:

$$0,006 \pm \frac{\delta(a'_t)_{E=0}}{(a'_t)_{E=0}} \pm 0,009 \quad (5.3)$$

Der relative Fehler in der Hb-Molalität, $\frac{\delta m_{Hb}}{m_{Hb}}$ ist gegeben durch die Wägegenauigkeit bei der Trockengewichtsbestimmung. Nach Gleichung (2.13) ergibt sich:

$$\frac{\delta m_{Hb}}{m_{Hb}} = \frac{1}{(1 - \xi)} \frac{\delta \xi}{\xi} \quad (5.4)$$

Mit $\frac{\delta \xi}{\xi} = \pm 0,001$ (siehe Seite 23)

und $\xi = 0,3652$:

$$\frac{\delta m_{Hb}}{m_{Hb}} = \pm 0,0016 \quad (5.5)$$

Der relative Fehler in der NaCl-Einwaagekonzentration beträgt (siehe Seite 33):

$$0,0008 \cong \frac{\delta m_z^{(o)}}{m_z^{(o)}} \cong 0,0014 \quad (5.6)$$

Mit diesen Einzelfehlern erhält man:

$$0,0063 \cong \frac{\delta(\gamma_z^*)}{\gamma_z^*} \cong 0,0093 \quad (5.7)$$

In Tabelle 5.1 sind zum Vergleich die "theoretischen" mittleren relativen Fehler $\delta(\gamma_z^*)/\gamma_z^*$ und die aus den experimentellen Fehlern berechneten relativen Standardabweichungen $\sigma(\gamma_z^*)/\gamma_z^*$ für einzelnen NaCl-Konzentrationen angegeben.

Tabelle 5.1: Vergleich der "theoretischen" mittleren relativen Fehler mit den relativen Standardabweichungen, berechnet aus den experimentellen Ergebnissen.

m_{NaCl}	$\sigma(\gamma_{\pm}^*)/\gamma_{\pm}^* \quad [\%]$	$\sigma(\gamma_{\pm})/\gamma_{\pm}^* \quad [\%]$
0,0102	$\pm 0,6$	$\pm 3,1$
0,0307	$\pm 0,6$	$\pm 1,6$
0,0513	$\pm 0,7$	$\pm 0,8$
0,0718	$\pm 0,7$	$\pm 0,8$
0,1025	$\pm 0,7$	$\pm 0,8$
0,3073	$\pm 0,8$	$\pm 0,4$
0,5171	$\pm 0,9$	$\pm 0,5$

Mit Ausnahme der Werte für die beiden niedrigsten NaCl-Konzentrationen stimmen die "theoretischen" und "experimentellen" Fehlerbreiten sehr gut überein. Die höheren Standardabweichungen bei NaCl-Konzentrationen unter 0,05 m deuten darauf hin, daß sich hier weitere, in dieser Abschätzung nicht enthaltene Fehlerquellen bemerkbar machen, wie etwa der Einfluß der Diffusion von KCl aus den Salzbrücken.

- 5.2 Mittlerer Fehler der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Cl^- -Ionen: (berechnet aus den Ergebnissen der Messung des mittleren Aktivitätskoeffizienten)

Die Bestimmungsgleichung für die Zahl der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Cl^- -Ionen $\bar{v}_-$, aus den $\gamma_{\pm}^{\circ}$ -Werten lautet: (siehe Gleichung 4.36 mit Gleichung 4.32)

$$\bar{v}_- = \frac{m_{\pm}^{(o)}}{m_{\text{Hb}}} \left[1 - \left(\frac{(a_{\pm}^{\circ})_{E=0}}{m_{\pm}^{(o)} \gamma_{\pm}^{\circ} \gamma_{\pm}^{(o)}} \right)^2 \right] \quad (5.8)$$

Daraus erhält man für den "theoretischen" mittleren Fehler in $\bar{v}_-$:

$$\delta \bar{v}_- = \sqrt{\bar{v}_-^2 \left[\frac{\delta m_{\text{Hb}}}{m_{\text{Hb}}} \right]^2 + \left[\bar{v}_- + 2 \frac{m_{\pm}^{(o)}}{m_{\text{Hb}}} \left(\frac{\gamma_{\pm}^{\circ}}{\gamma_{\pm}^{(o)}} \right)^2 \right]^2 \left[\frac{\delta m_{\pm}^{(o)}}{m_{\pm}^{(o)}} \right]^2 + \left[2 \frac{m_{\pm}^{(o)}}{m_{\text{Hb}}} \left(\frac{\gamma_{\pm}^{\circ}}{\gamma_{\pm}^{(o)}} \right)^2 \right]^2 \left[\frac{\delta (a_{\pm}^{\circ})_{E=0}}{(a_{\pm}^{\circ})_{E=0}} \right]^2} \quad (5.9)$$

Tabelle 5.2 zeigt die so berechneten $\delta \bar{v}_-$ -Werte zusammen mit den experimentellen Standardabweichungen $\sigma(\bar{v}_-)$ bei den verschiedenen NaCl-Konzentrationen.

Auch hier zeigt sich wieder eine gute Übereinstimmung der "theoretischen" mit den "experimentellen" Fehlerbreiten.

Tabelle 5.2: Vergleich der "theoretischen" relativen mittleren Fehler mit der Standardabweichung berechnet aus den Ergebnissen.

$m_{\pm}^{(o)}$	$\delta(\bar{y}_{-})$	$\sigma(y_{-})$
0,0102	$\pm 0,01$	$\pm 0,04$
0,0307	$\pm 0,03$	$\pm 0,07$
0,0513	$\pm 0,05$	$\pm 0,07$
0,0718	$\pm 0,08$	$\pm 0,09$
0,1025	$\pm 0,11$	$\pm 0,16$
0,3073	$\pm 0,44$	$\pm 0,25$
0,5171	$\pm 0,85$	$\pm 0,46$

- 5.3 Mittlerer Fehler der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Cl^- -Ionen: (berechnet aus den Ergebnissen der pH-Messung)

Für den mittleren Fehler für $\bar{v}'$ ergibt sich nach Gleichung (4.38):

$$\delta \bar{v}' = \frac{1}{0,868 \cdot w} \sqrt{(\delta \text{pH})^2 + (\delta \text{pH}_0)^2} = \frac{\delta \text{pH} \cdot \sqrt{2}}{0,868 \cdot w} \quad (5.10)$$

wegen: $\delta \text{pH} \approx \delta \text{pH}_0$

Mit einer pH-Meßunsicherheit von $\delta \text{pH} = \pm 0,01$ erhält man die in Tabelle 4.4 und Abbildung 4.2, Seite 88, 89, angegebenen mittleren Fehler von $\bar{v}'$.

Zusammenfassung und Schlußfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde der mittlere Aktivitätskoeffizient von NaCl verschiedener Konzentration in konzentrierten isoionischen Hämoglobininlösungen bestimmt. Zusätzlich wurde die Abhängigkeit des pH-Wertes der Hämoglobin-NaCl-Lösung von der NaCl-Konzentration untersucht. Die Hämoglobinkonzentration betrug 36,52 Gew.-% und entsprach somit etwa der Hämoglobinkonzentration in Erythrozyten. Die NaCl-Konzentration variierte zwischen 0,01 und 0,5 Mol pro kg Wasser.

Durch die Bestimmung des mittleren stöchiometrischen Aktivitätskoeffizienten von NaCl in der Hämoglobininlösung konnte die Aussage anderer Autoren (45, 46, 47), daß der größte Teil der Ionen in konzentrierten Protein-Salz-Lösungen in freier Form vorliegt, bestätigt werden.

Der mittlere stöchiometrische Aktivitätskoeffizient von NaCl nahm mit steigender NaCl-Konzentration gegenüber dem Wert in reinen NaCl-Lösungen gleicher Molalität zu; diese Zunahme betrug jedoch maximal nur 6,5 %.

Zur Interpretation dieser Ergebnisse wurden elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Salzionen und den Hämoglobinemolekülen und die Bindung von Ionen und Wasser am Hämoglobinemolekül betrachtet.

Nach Berücksichtigung von 0,3 g "gebundenen" Wassers pro Gramm Hämoglobin, das als "non-solvent-water" den Salzionen nicht mehr als Lösungsraum zur Verfügung steht,

ergaben sich mittlere Aktivitätskoeffizienten von NaCl, die um nur 12 bis 17 % niedriger lagen als in reinen NaCl-Lösungen gleicher Molalität; die Erniedrigung war bei den niedrigeren NaCl-Konzentrationen am größten.

Deutet man diese für die Bindung von Wasser am Hämoglobinmolekül korrigierten Aktivitätskoeffizienten als durch die spezifische Bindung von Na^+ - oder Cl^- -Ionen am Hämoglobinmolekül bedingt, so erhält man für die Zahl der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Na^+ - oder Cl^- -Ionen Werte, die von 0,4 bei 0,01 m NaCl bis 13,0 bei 0,5 m NaCl ansteigen.

Die pH-Messung ergab mit der NaCl-Konzentration monoton ansteigende Werte. Daraus konnte geschlossen werden, daß Cl^- -Ionen spezifisch am Hämoglobinmolekül gebunden werden, wie das auch in anderen Protein-Salz-Lösungen gefunden wurde. Die Anwendung der Theorie von SCATCHARD und TANFORD lieferte 0,6 bis 13,5 im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundene Cl^- -Ionen für NaCl-Konzentrationen von 0,01 bis 0,5 Mol pro kg Wasser. Diese Ergebnisse und die gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Messungen des mittleren Aktivitätskoeffizienten führten zu dem Schluß, daß die gefundene Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl in den isotonischen Hämoglobin-NaCl-Lösungen nach Korrektur für "non-solvent-water" durch die spezifische Cl^- -Ionenbindung am Hämoglobinmolekül bedingt ist.

Die Anwendung der Theorie der multiplen Gleichgewichte von SCATCHARD und TANFORD auf die Ergebnisse für die Zahl der gebundenen Cl^- -Ionen in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration zeigte jedoch, daß die Werte für die

mittleren Aktivitätskoeffizienten noch einen Anteil enthalten, der auf die elektrostatischen Wechselwirkungen der durch die Bindung von Cl^- -Ionen negativ geladenen $\text{Hb}(\text{Cl}^-)_{\bar{\gamma}}$ -Moleküle mit den Salzionen zurückgeht. Eine Abschätzung ergab, daß der elektrostatische Anteil des mittleren Aktivitätskoeffizienten bei niedriger NaCl-Konzentration in der Hämoglobin-NaCl-Lösung nur gering ist: Bis 0,1 Mol NaCl pro kg Wasser beträgt der Beitrag der elektrostatischen Wechselwirkung zur Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten weniger als 25 % des gesamten Effekts. Mit zunehmender NaCl-Konzentration wird dieser Beitrag immer größer und übertrifft bei einer NaCl-Konzentration von 0,45 Mol NaCl pro kg Wasser den Anteil, der durch die spezifische Bindung von Cl^- -Ionen bedingt ist.

Die prozentuale Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten von NaCl durch die negative Ladung der $\text{Hb}(\text{Cl}^-)_{\bar{\gamma}}$ -Moleküle steigt nach dieser Abschätzung von etwa 4 % bei 0,05 m NaCl auf etwa 14 % bei 0,5 m NaCl an.

Für die spezifische Cl^- -Bindung berechnete sich aus den pH-Messungen eine Zahl von 33 Cl^- -Bindungsstellen am Hämoglobinmolekül mit einer Bindungskonstanten von 4,7.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen gut mit den Befunden von PFISTER und RÄMISCH überein, die in hochkonzentrierten RSA-KCl- bzw. RSA-NaCl-Lösungen ebenfalls nur eine geringfügige Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten des Salzes durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Proteinionen fanden. Darüber hinaus bestätigten sie die Interpretation von MENGES (36)

und RAU (50), nach der die von ihnen gefundene Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten des Salzes (nach Berücksichtigung des "non-solvent-water") in Hämoglobin-KCl- bzw. Hämoglobin-NaCl-Lösungen verschiedener Hb-Konzentrationen bei einer Salzkonzentration von 0,1 Mol pro kg Wasser hauptsächlich einer spezifischen Cl^- -Bindung am Hämoglobinmolekül zuzuschreiben ist. Daß in der übrigen Literatur bisher eine Cl^- -Bindung am Hämoglobinmolekül nicht beschrieben worden ist, dürfte darauf zurückzuführen sein, daß stets nur sehr viel niedrigere Hämoglobinkonzentrationen verwendet worden waren als in den erwähnten und in der vorliegenden Arbeit.

Da nach zahlreichen Untersuchungen (5, 10, 22, 30, 38, 39, 40, 41, 42) angenommen werden darf, daß die elektrischen und thermodynamischen Eigenschaften des Zytoplasmas lebender Zellen nicht erheblich von denen in konzentrierten Makromolekül-Salz-Lösungen abweichen, erhärten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Annahme, daß auch im Zytoplasma der größte Teil der kleinen Ionen als "frei" zu betrachten ist.

Literaturverzeichnis

1. G.S. ADAIR,
M.E. ADAIR: Proc. Roy. Soc. (London)
A 90 (1947), 341
2. H. AEBI: Einführung in die prak-
tische Biochemie, Karger,
Germering (München), 1965,
S. 220
3. C.H. AMERG: J. Amer. Chem. Soc. 79
(1957), 3980
4. P. ANDREWS: Biochem. J. 91 (1964), 222
5. E.L. ANDRONIKASHVILI,
G.M. MREVLISHVILI,
P.L. PRIVALOV: In I.P. KAYUSHIN (Ed.)
"Water in Biological System",
übersetzt aus dem Russ.,
Consultants, New York, 1969,
p. 63
6. E.L. ANDRONIKASHVILI,
G.M. MREVLISHVILI,
P.L. PRIVALOV: on loc. cit. (93), p. 67
7. R. ARNOLD,
J. Th. OVERBECK: Rec. trav. chem. 69 192
(1950)
8. R.L. BERGER: Human Isoionic Hemoglobin:
Preparation And Kinetic Pro-
perties University of Cali-
fornia, San Diego La Jolla,
Anal. Let., 6 (2) 125 - 138,
1973
9. H.B. BULL,
K. BREESE: Arch. Biochem. Biophys.
128 (1968), 488
10. W.H. BUNCH,
G. KALLSEN: Schience 164 (1969), 1178

11. C.W. CARR: Arch. Biochem. Biophys.
62 (1956), 476
12. CHIAONE und
GILBERT: Manuscript wird bearbei-
tet (1965) in M.F. PERUTZ
(siehe 44.)
13. B.E. CONWAY: Electrochemical Data,
Elsevier Publ. Comp., Am-
sterdam, Houston, London,
New York, 1952
14. D.J. COX,
V.N. SCHUMAKER: J. Amer. Chem. Soc. 83
(1961), 2433
15. D.A.T. DICK: "Cell Water", Butterworth,
London, 1966, p. 36 ff.
16. DAVID L. DRABKIN: A Simplified Technique for
a large Scale Crystalli-
sation of Human Oxyhaemo-
globin.....
University of Pensilvania,
Philadelphia, July 30, 1948
17. D.L. DRABKIN,
J.H. AUSTIN: J. Biol. Chem. 112 (1935 -
1936), 105
18. D.L. DRABKIN: J. Biol. Chem. 185 (1950),
231
19. C.M. GARY-BOBO: J. Gen. Physiol. 50 (1967),
2547
20. J.H.B. GEORGE,
R.A. HORNE,
C.R. SCHLAICKER: J. Elektrochem. Soc. 117
(1970), 892
21. E.A. GUGGENHEIM: J. Phys. Chem. 34 (1930),
1758

22. G. HASL,
H. PAULY: Biophysik 7 (1971) 283
23. C. HAZLEWOOD,
B. NICHOLS,
N.F. CHAMBERLAIN: Nature 222 (1969), 747
24. F. HELFERICH: Disc. Farad. Soc. 21
(1956), 83
25. G.P. HESS,
J.A. RUPLEY: Structure and Function of
Proteins Cornell University,
Ithaca, New York
University of Arizona, Tuc-
son ann. rev. of Biochemi-
stry Vol 40 1971 (1023)
26. J.A. HINSON,
T.L. McMEEKIN: A Rapid Method for Preparance
Crystallin Human Haemoglobin
and the Separation of Crystal-
lin Haemoglobin A in Quantity
University of South Carolina,
Columbia, March 6, 1969
Biochemical and Biophysical
Research Communications Vol 35,
No 1, 1969
27. E.M. JOPE in
F.C.W. ROUGHTON,
C.E. KENDREW, (Ed.): "Haemoglobin", Butterworth,
London 1949, p. 205
28. W. KONIGSBERG,
G. GUIDOTTI und
R.J. HILL: J. Biol. Chem. 236, 1961
29. G. KORTÜM: "Lehrbuch der Elektrochemie",
Verlag Chemie, Weinheim/Berg-
straße, 1966, p. 135, S. 270
30. M.J. KUSHMERICK,
R.J. PODOLSKY: Science 166 (1969) 1297

31. G.N. LING: Ann. N.Y. Acad. Sci. 125
(1965)
32. G.N. LING: "A Physical Theory of the
Living State: The Association
Induction Hypothesis",
Blaisdell, New York, 1962
33. G.N. LING: Internatl. Rev. Cytology 26
(1969), 1
34. G.N. LING, Science 163 (1969), 1335
F.W. COPE:
35. D. MARTINEZ, Biophys. J. 2 (1969), 1256
A.A. SILVIDI,
R.M. STOKES:
36. G. MENGES: Dissertation, Erlangen 1973
37. J.L. ONCLEY: In E.J. COHN, J.T. EDSALL:
"Proteins, Amino Acids and
Peptides as Ions and Dipolar
Ions, Reinhold Publ. Comp.,
New York, 1943, p. 543
38. H. PAULY: Biophysik 1 (1963) 143
39. W. BEIER (Ed.): "Physikalische Grundlagen der
Medizin; Abhandlungen aus der
Biophysik", Heft 7, Edition
Leipzig 1967 p. 85
40. H. PAULY, Biophysik J. 6 (1966), 621
H.P. SCHWAN:
41. H. PAULY, ONR Techn. Report 28, 1959,
H.P. SCHWAN: University of Pensilvania,
Elektromed. Lab., The Moore
School of Elektrical
Engineering

42. H. PAULY: Nature, 183 (1959), 333
43. H. PAULY: Biophysik 10, 7-32 (1973)
44. M.F. PERUTZ: Structure and Function of Haemoglobin
A Tentative Atomic Model of Horse Oxyhaemoglobin
Medical Research Council Laboratory of Molekular Biology Hills Road, Cambridge, England
J. Mol. Biol. (1965), 13
646-668
45. H. PFISTER: Dissertation, Erlangen 1971
46. H. PFISTER: Z. Naturf. 25 b (1970), 1130
61. H. PFISTER, H. PAULY: Biophysik 6 (1969), 94;
Pflügers Arch. 319 (1970), R 163 (38. Tagung der Dt. Physiolog. Ges., 1970, Erlangen)
47. H. PFISTER, H. PAULY: J. Polym. Sci. C, No 39, (1972), pp. 179-189
48. P.L. PRIVALOV, G.M. MREVLISHVILI: In L.P. KAYUSHIN (Ed.): "Water in Biological Systems", übersetzt aus dem Russ., Consultants Bureau, New York, 1969, p. 63
49. D. RÄMISCH: Persönliche Mitteilungen
50. H. RAU: Persönliche Mitteilungen
51. D. ROSEN: Trans. Farad. Soc. 59 (1963) 1211

52. G. SCATCHARD: J. Amer. Chem. Soc. 75
(1953), 2883
53. G. SCATCHARD, J. Ann. Chem. Soc. 49 12
J.S. COLEMAN, (1957)
AL. SHEN:
62. SCHROEDER et al., In M.F. PERUTZ (siehe 44)
BRAUNITZER et al.,
HILL,
KONIGSBERG et al.:
54. K. SOLLNER: Ann. N.Y. Acad. Sci. 148
(1968), 154
55. J. STEINHARDT, "Multiple Equilibria in
J.A. REYNOLDS: Proteins", Acad. Press,
New York und London, 1969,
p. 214 ff., 316 ff.
56. C. TANFORD, J. Ann. Chem. Soc. 78 5282
J.D. HAUENSTEIN: (1956)
57. C. TANFORD: "Physical Chemistry of Ma-
cromolecules", New York,
Sydney, London, (1965)
58. TANFORD und In M.F. PERUTZ (siehe 44)
KIRSHNER:
59. A.S. TROSHIN: "Problems of Cell Permea-
bility", Pergamon Press, Oxford
1966
60. J.Th.G. OVERBEEK: J. Colloid Sci. 8 (1953) und
Progr. Biophys. Chem. 6 (1956),
57

Herrn Prof. Dr. Dr. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, die ich am Institut vorfand.

Auch Herrn Dr. Pfister möchte ich für die vorbildliche Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Zu ihm konnte ich mit vielen Fragen kommen, die er mir immer mit Geduld und Ausdauer beantwortete.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Institut, die mir in den vielen Stunden, die ich dort verbrachte, mit Rat und Tat zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle meine Eltern erwähnen, die mir auf dem langen Weg des Lernens viel Verständnis und Opferbereitschaft entgegenbrachten. Auch ihnen gebührt mein herzlicher Dank.

Lebenslauf

Ich, Norbert Tretter, Sohn des Bundesbahnbeamten Johann Tretter und seiner Ehefrau Irmgard, geborene Meister, bin am 21. August 1949 in Erbendorf geboren. Mit sechs Jahren kam ich in die Volksschule Erbendorf. Nach Abschluß der 5. Volksschulklasse trat ich am 23. Juli 1960 in das Keplergymnasium Weiden über. Am 28. Juni 1969 erhielt ich an dieser Schule das Zeugnis der Reife.

Nachdem ich mich über die zentrale Registrierstelle für das Studium der Medizin beworben habe, wurde mir ein Studienplatz an der Universität Würzburg zugeteilt. Am 8. Oktober 1969 konnte ich mich dort immatrikulieren. Am 9. Oktober 1970 bestand ich an dieser Universität die naturwissenschaftliche, am 23. März 1972 die ärztliche Vorprüfung. Im Sommersemester 1972 erhielt ich für das 1. klinische Fachsemester einen Studienplatz an der Universität Erlangen-Nürnberg. An dieser Universität meldete ich mich im Februar 1975 zur ärztlichen Prüfung und konnte sie am 22. Juli 1975 erfolgreich abschließen.

Offsetdruckerei HÖGL, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109, Tel. 22990